
BACHELORARBEIT

Herr
Philipp Dörschmann

**Auswirkungen der
Transportbedingungen auf den
Nachweis von Legionellen in
Warmwasser**

Mittweida, 2013

BACHELORARBEIT

Auswirkungen der Transportbedingungen auf den Nachweis von Legionellen in Warmwasser

Autor:

Herr

Philipp Dörschmann

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI10w1-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. Petra Radehaus

Zweitprüfer:

Dipl.-Geoökol. Claudia Wagner

Einreichung:

Mittweida, 23.08.2013

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2013

Bibliographische Beschreibung:

Dörschmann, Philipp: Auswirkungen der Transportbedingungen auf den Nachweis von Legionellen in Warmwasser. - 2013. – 9 Seiten Verzeichnisse, 57 Seiten Inhalt, 21 Seiten Anhänge S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Bachelorarbeit, 2013

Englischer Titel

Impact of transport conditions on *Legionella* testing results in hot water samples.

Kurzbeschreibung:

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen des Probentransportes von Warmwasser auf die mikrobiologischen Analyseergebnisse für Legionellen erläutert. Dazu werden entsprechende Grundlagen zur Legionellenproblematik, Vergleiche mit der Norm zum Probentransport, die experimentelle Durchführung und anschließend Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt. Die Ergebnisse werden wissenschaftlich ausgewertet, eine Datengrundlage für die bestehenden Normen erstellt und Empfehlungen für zukünftige Untersuchungen beschrieben.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Menschen, die mir bei meiner Bachelorarbeit zur Seite standen und mich mit Rat und Tat unterstützt haben. Ich bedanke mich bei synlab Umweltinstitut GmbH Leipzig und Stollberg. Dabei richtet sich besonders mein Dank an Frau Dipl.-Geoökol. Claudia Wagner und Frau Dipl.-Chem. Antje Flechsig, da sie mir eine Bachelorarbeit bei der Firma ermöglicht haben und mir als Betreuerinnen mit Rat zur Seite standen. Außerdem bedanke ich mich bei der Prodekanin der naturwissenschaftlichen Fakultät, Frau Prof. Dr. Radehaus, dass sie mir bei dem Thema als Hochschulbetreuerin zur Verfügung stand und mich unterstützt hat. Besonderer Dank geht an Herrn M.Sc. René Kretschmer und Frau Julia Geßner, die mir zusätzlich bei der Arbeit geholfen haben und mir Hinweise und Verbesserungsvorschläge gegeben haben. Großer Dank für weitere Unterstützung außerhalb der Abschlussarbeit geht auch an meine Freundin, sowie ihrer Familie und meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung	1
1.2 Humanpathogene Legionellen	1
1.3 Probennahme und Probentransport laut DIN EN ISO 19458	2
1.3.1 Probennahme	3
1.3.2 Probentransport.....	5
1.4. Eigenschaften von Legionellen, die wichtig für den Einfluss des Untersuchungsergebnisses sein können.....	6
1.5 Legionellendiagnose	7
1.6 Vorgehensweise für die Bachelorarbeit.....	8
1.7 Statistische Grundlagen für mikrobiologische Analysen.....	9
2 Zielstellung	12
3 Material.....	13
3.1 Chemikalien	13
3.2 Lösungen.....	13
3.3 Medien	13
3.4 Molekularbiologische Reagenzien.....	14
3.5 Material.....	14
3.6 Geräte.....	14
4 Methoden	16
4.1 Herstellung der Prüflösung und Voruntersuchungen.....	16
4.2 Ansetzen der Wasserproben.....	17
4.3 Simulation des Probentransportes.....	18
4.3.1 Ansetzen von Arbeitspaket 2, 3 und 4	18
4.3.2. Ansetzen von Arbeitspaket 6, 7 und 8	18
4.3.3. Ansetzen von Arbeitspaket 9, 11 und 13	19
4.3.4 Ansetzen von Arbeitspaket 12	19

4.3.5 Ansetzen von Arbeitspaket 10, 14 und 15	19
4.3.6 Ansetzen Arbeitspaket 24 und 25	19
4.4 Weitere Einflussmöglichkeiten	20
4.4.1 Einfluss von Legionellensäurepuffer und verschiedenen Chemikalien	20
4.4.2 Einfluss des Chlorgehaltes	20
4.4.4 Einfluss der Füllmenge der Probenflasche	21
4.5. Versuche mit nährstoffreichen Wässern	21
4.5.1 Überprüfung des Verhaltens von Legionellen in realem Warmwasser	21
4.5.2 Qualitativer Nachweis von Amöben	21
4.5.3 Verhalten in einer nährstoffspezifischen Suspension	22
5 Ergebnisse.....	23
5.1 Auswerten der Voruntersuchung	23
5.2 Ergebnisse Arbeitspakt 2,3 und 4	25
5.3. Ergebnisse Arbeitspaket 6,7 und 8	26
5.4 Ergebnisse Arbeitspakete 9, 11 und 13.....	28
5.5 Ergebnisse Arbeitspaket 12 im Vergleich zu Arbeitspaket 7	29
5.6 Ergebnisse Arbeitspakete 10, 14 und 15	30
5.7 Ergebnisse des Säure-/Spülungsansatzes.....	32
5.8 Darstellung des Einflusses der Füllmenge der Probenflasche	32
5.9 Ergebnisse Chlorgehalt	33
5.10 Ergebnisse reales Wasser.....	34
5.11 Ergebnisse AP 24.....	38
5.12 Ergebnisse AP 25.....	39
5.13 Hefeextrakt-Suspension	39
6 Diskussion	41
6.1 Bewertung der Vorversuche und der Verwendung einer Kryokultur	41
6.2 Probenwasser aus einem realen System.....	43
6.3 Bewertung der Arbeitspakete 2,3 und 4, sowie 14, 15 und 23	44
6.3.1 Einfluss der Transportzeit und der Ausgangskonzentration auf das Untersuchungsergebnis	44
6.3.2 Einfluss der Ausgangstemperatur auf das Untersuchungsergebnis	45
6.3.3 Einfluss von Kühlmöglichkeiten	46

6.3.4 Einfluss einer sehr hohen Ausgangskonzentration.....	47
6.3.5 Einfluss der Füllmenge der Probenflaschen und der Art der Flasche.....	48
6.4 Bedeutung der Lagerung in Kühlzellen	48
6.4.1 Lagerung ohne Öffnungssimulation	48
6.4.2 Lagerung nach 8 h mit Simulation der Kistenöffnungen.....	49
6.5 Bedeutung der Lagerungstemperatur und des Lichteinflusses, sowie des Chlorgehaltes	50
6.6 Einfluss der mikrobiologischen Analysefaktoren.....	52
6.7 Bedeutung der Nutzung von künstlichem Probenwasser	53
7 Ausblick	55
7.1 Empfehlung für zukünftige Probentransporte.....	55
7.2 Weitere Untersuchungsmöglichkeiten	55
8 Zusammenfassung	57
9 Summary.....	58
Literaturverzeichnis	59
Anhang.....	61
Selbstständigkeitserklärung.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verwendete Transportboxen.....	4
Abbildung 2: Inhalt einer Transportbox	4
Abbildung 3: Probenentnahme des Vorlaufs	5
Abbildung 4: Styroporboxen für Simulation des Probentransportes	9
Abbildung 5: Poisson-Verteilung der Mehrfachbestimmung	24
Abbildung 6: Beispielplatte des Vorversuches der zehnfachen Bestimmungsreihe.....	25
Abbildung 7: Vergleich von AP 2, 3 und 4 bei GK.....	26
Abbildung 8: Vergleich von AP 2, 3 und 4 in der HK	26
Abbildung 9: Vergleich der unterschiedlichen Kühlzeiten für die GK	27
Abbildung 10: Vergleich der unterschiedlichen Kühlzeiten bei HK.....	27
Abbildung 11: Vergleich von AP 2, 7, 9, 11, 13 bei GK.....	28
Abbildung 12: Vergleich von AP 2, 7, 9, 11 und 13 bei HK.....	29
Abbildung 13: Simulation der Kistenöffnungen im Vergleich zu AP 7.....	29
Abbildung 14: Ergebnisse Vorkühlung Probeflaschen.....	30
Abbildung 15: Ergebnisse höchste Konzentration.....	31
Abbildung 16: Ergebnisse 55 °C Ausgangstemperatur	31
Abbildung 17: Abhängigkeit von der Füllmenge	33
Abbildung 18: AP 7 reale Probe	35
Abbildung 19: AP 9 reale Probe	35
Abbildung 20: AP 5 reale Probe	36
Abbildung 21: AP 6 reale Probe	36
Abbildung 22: AP 4 reale Probe	37
Abbildung 23: AP 13 reale Probe	37
Abbildung 24: Vergleich unterschiedlicher Probeflaschen	38
Abbildung 25: Vergleich der Verwendung von Kühlakkus und Crush-Eis	39
Abbildung 26: Koloniezahlverlauf in Hefeextrakt-Suspension.....	40
Abbildung 27: Abkühlungsdauer Kühlakkus	61
Abbildung 28: AP 2 GK	65
Abbildung 29: AP 2 HK	65
Abbildung 30: AP 3 GK	66
Abbildung 31: AP 3 HK	66

Abbildung 32: AP 4 GK	67
Abbildung 33: AP 4 HK	67
Abbildung 34: AP 6 GK	68
Abbildung 35: AP 6 HK	68
Abbildung 36: AP 7 GK	69
Abbildung 37: AP 7 HK	69
Abbildung 38: AP 8 GK	70
Abbildung 39: AP 8 HK	70
Abbildung 40: AP 9 GK	71
Abbildung 41: AP 9 HK	71
Abbildung 42: AP 11 GK	72
Abbildung 43: AP 11 HK	72
Abbildung 44: AP 13 GK	73
Abbildung 45: AP 13 HK	73
Abbildung 46: AP 12 GK	74
Abbildung 47: AP 12 HK	74
Abbildung 48: AP 10 GK	75
Abbildung 49: AP 10 HK	75
Abbildung 50: AP 14 25 °C.....	76
Abbildung 51: AP 14 45 °C.....	76
Abbildung 52: AP 15 GK	77
Abbildung 53: AP 15 HK	77
Abbildung 54: AP 23 50 ml.....	78
Abbildung 55: AP 23 150 ml.....	78
Abbildung 56: AP 23 200 ml.....	79
Abbildung 57: AP 24 GK	79
Abbildung 58: AP 24 HK	80
Abbildung 59: AP 25 GK	80
Abbildung 60: AP 25 HK	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswertung der Medien des Vorversuches	23
Tabelle 2: Prozentualer Anteil der Koloniezahlen im Vergleich zur Membranfiltration ohne Spülung oder Säurebehandlung	32
Tabelle 3: Mehrfachbestimmung echtes Wasser	34
Tabelle 4: Prozentualer Abgleich der Ergebnisse von AP 7 und AP 12.....	49
Tabelle 5: Vorversuche.....	61
Tabelle 6: Hauptuntersuchung Teil 1.....	62
Tabelle 7: Hauptuntersuchung Teil 2.....	63
Tabelle 8: Sonstige Untersuchungen	64

Abkürzungsverzeichnis

AP	Arbeitspaket
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract (dt. gepuffelter Aktivkohle-Hefeextrakt)
EZ	easy (dt. leicht)
GK	Grenzwertkonzentration
GVPC	Glycin-Vancomycin-Polymyxin-Cycloheximid
HK	höhere Konzentration
KBE	Kolonie bildende Einheit
NN	Non-Nutrient
VBNC	viable but not culturable (dt. lebensfähig, aber nicht kultivierbar)

1 Einleitung

Ein exaktes, unverfälschtes Untersuchungsergebnis mikrobiologischer Analysen ist besonders wichtig, um die Verunreinigung und Pathogenität durch gesundheitsgefährdende Keime zu klären und um festzustellen, ob Grenzwerte in verschiedenen Wässern überschritten werden. Dazu zählen vor allem auch Warmwasserbakterien, wie Legionellen, die ein erhebliches Gesundheitsrisiko in den Warmwasserleitungssystemen bedeuten. Um die Warmwasserproben im Labor zu analysieren, sind eine vorherige Probennahme und ein Probentransport nötig. Wie repräsentativ letztendlich das Ergebnis ist hängt von den Bedingungen des Transportes ab und das ist die Hauptproblematik dieser Arbeit. Nachfolgend werden dazu spezifische Grundlagen geschaffen. Es wird auf die Bakteriengattung *Legionella* eingegangen, sowie Details zum Probentransport und bereits bekannte Auswirkungen erläutert. Außerdem werden die mikrobiologische Herangehensweise erklärt und statistische Informationen aufgeführt.

1.1 Einführung

Man stelle sich vor, es wäre das Jahr 1976 und man befände sich in den Vereinigten Staaten von Amerika in der Stadt Philadelphia zum Übernachten in einem Hotel. Nichtsahnend verbringt man eine Nacht im Hotelzimmer ohne zu wissen, dass man sich einer bis dahin unbekannten Gefahr aussetzt. Plötzlich wird es warm, man erbricht sich und die Lunge fängt an zu kratzen. Der Kopf schmerzt und Grippe ähnliche Symptome treten am ganzen Körper auf. Dazu kommt, dass man nicht der einzige Hotelgast ist, denn 200 weitere Menschen aus dem Hotel leiden unter den gleichen Symptomen, eine Epidemie hat sich praktisch über Nacht ausgebreitet und 30 Menschen sterben an den Folgen. Bis dahin war sich noch keiner der neu entdeckten Gefahr aus den Wasserleitungen namens *Legionella* bewusst [Behling, 2004].

1.2 Humanpathogene Legionellen

Allerdings gibt es die Bakteriengattung der Legionellen schon länger. Bereits im Jahre 1947 und 1968 gab es Epidemien (z.B. in Pontiac), die im Nachhinein den Legionellen

zugeschrieben wurden. In Deutschland sind die Erreger seit den 80er Jahren Diskussionsstoff, da diese sich vermehrt in den Warmwasserleitungssystemen der Haushalte und öffentlichen Einrichtungen ansiedeln. Bis heute sind 48 Legionellenarten mit insgesamt 70 Serogruppen bekannt [Behling, 2004].

Legionella pneumophila wird hauptsächlich als Auslöser der Legionärskrankheit (Legionella-Pneumonie) und des Pontiac-Fiebers angesehen und führt durch das Einatmen von Aerosolen zur Infektion. Eine Infektion mit Legionellen erfolgt je nach Stärke des Immunsystems, bakterieller Belastung des Wassers, Wirksamkeit der Verbreitung aus einem Reservoir, Infektionskraft des Stammes und Art des Aerosols [Behling, 2004].

Die heute gut erforschten Keime befinden sich weltweit in den verschiedensten Wässern, wie Grundwasser und Oberflächengewässern, in geringer Anzahl (meistens viel weniger als 1 KBE/l (Kolonie bildende Einheit/Liter) und gelangen über das Rohwasser in die Trinkwassersysteme und andere Wasserleitungssysteme, so auch bei Badewasseraufbereitungsanlagen. Durch ihre Wärmetoleranz haben sie z.B. in der Trinkwasserinstallation ihre ökologische Nische gefunden [URL-1].

Dabei befinden sie sich nicht selten in verschiedenen Protozoen, wie Amöben und sind damit geschützt und können sich besser vermehren. Die Anzahl der Legionellen im Wasser hängt ab von der Stagnationszeit, Luftfeuchtigkeit (ideal bei 80-90 %), der Nahrungsgrundlage, dem pH-Wert (ideal bei 6,85-6,95) und besonders der Temperatur. Optimale Wachstumsbedingungen werden dabei bei Temperaturen von 36 ± 1 °C erreicht [Behling, 2004].

1.3 Probennahme und Proben transport laut DIN EN ISO 19458

Um die für den Menschen gefährliche Konzentration der Legionellen zu vermindern oder um diese auszuschließen, ist ein exaktes, unverfälschtes Untersuchungsergebnis bei dem quantitativen mikrobiologischen Nachweisverfahren nötig. Dazu werden in regelmäßigen Abständen verschiedene öffentliche Einrichtungen und Hausinstallationssysteme beprobt, um eine Infektionsgefahr auszuschließen oder Verunreinigungsursachen zu klären. Es wird damit die Einhaltung von behördlichen Qualitätsspezifikationen gewährleistet. Außerdem wird die Verunreinigung charakterisiert, indem Größe und Schwankungen (Trends, Zyklen, Zufälligkeiten) dieser

analysiert werden [DIN EN ISO 19458, 2006]. Zur Einhaltung der europäischen Richtlinien werden diese unter anderen durch die deutsche Norm EN ISO 19458:2006 umgesetzt. In dieser sind Maßnahmen und Regeln für die Probennahme und den Probentransport für mikrobiologische Untersuchungen vorgegeben.

1.3.1 Probennahme

Die Probennahme wurde zur besseren Anschauung und zum Verständnis einmalig persönlich begleitet, damit auch weitere Einflussmöglichkeiten bedacht werden konnten. Die Probenahme der Wasserproben aus dem realen System wurde selbst durchgeführt.

Der Probennehmer muss alle benötigten Utensilien in seiner Transportkiste haben. Die weitere Bestückung ist ihm selbst überlassen. Die Kühlung der Proben durch geeignete Kühlmittel sollte im Vorfeld abgeklärt werden, generell werden vier Kühlakkus verwendet. Als Kiste wird vorzugsweise eine stabile Kunststoffbox genommen (siehe Abbildung 1). Zur Anwendung kommen auch Styroporboxen, die jedoch unhandlicher sind. Wichtig ist nur, dass diese die Proben abdunkeln. In der Kiste sollten sich auch Messbecher, Handbrenner mit Ersatzkartusche, leere 200-ml-Probenflaschen aus Polypropylen, Inbusschlüssel, Zellstofftücher, 70%-iges Ethanol-Desinfektionsmittel (Sprühflasche), ein Temperaturmessgerät und eine Rohrzange befinden (einige Bestandteile in Abbildung 2 zu sehen). Die Probeflaschen müssen innen steril sein. In diesen wird 20 g Natriumthiosulfat vorgegeben, um Oxidationsmittel, wie Chlor, zu inaktivieren. Des Weiteren sollten die Flaschen immer mit mindestens 150 ml Wasser gefüllt werden. Probenahmestellen eines Objektes für Warmwasseranalytik sind z.B. der Haustechnikraum, in dem vom Vorlauf und der Zirkulation des Heizungssystems Proben genommen werden, wie in Abbildung 3 zu sehen ist. Außerdem sollten am obersten Punkt der Steigleitungen Proben genommen werden, welches meistens an Waschbecken der obersten Etage durchgeführt wird (ansonsten Duscharmatur). Es wird Warmwasser eingestellt, dieses kurz laufen gelassen und anschließend die Entnahmestelle chemisch desinfiziert (wenn keine Plastikbestandteile vorhanden, thermische Desinfizierung mit Brenner). Dazu wird die Entnahmestelle mit Ethanol besprüht und 3 min einwirken gelassen. Anschließend wird Wasser laufen gelassen und die Temperatur bestimmt, sowie die leere Probenflasche befüllt. Des Weiteren wird die Maximaltemperatur nach spätestens 120 s bestimmt. Es werden zuerst ca. 6-8 Flaschen

genutzt und diese dann zu einer anderen Transportbox in das Transportauto gebracht und neue leere Flaschen genommen. Die Aufträge an einem Objekt sollten auch am gleichen Tag durchgeführt werden, somit werden die Proben in der Regel innerhalb von 2-8 h zum Labor transportiert.



Abbildung 1: Verwendete Transportboxen



Abbildung 2: Inhalt einer Transportbox

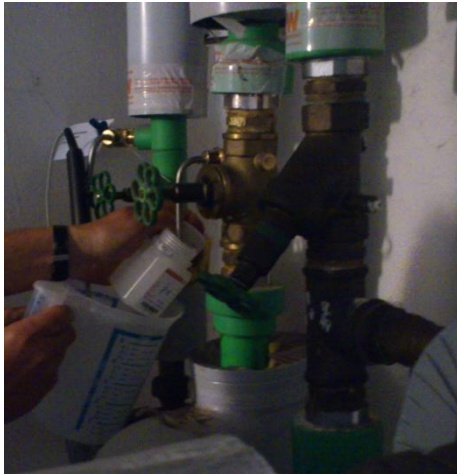


Abbildung 3: Probenentnahme des Vorlaufs

1.3.2 Probentransport

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit den Auswirkungen des Probentransportes auf die Legionellen, denn ab dem Zeitpunkt der Probennahme wird die tatsächliche Konzentration der Legionellen beeinflusst. Der Transport der Wasserproben, sowie deren Lagerung wird in der DIN EN ISO 19458 vorgegeben. Die Arbeit dient der Erschaffung einer Datengrundlage zur Problematik und einem Vergleich mit der bestehenden Norm.

In der Norm wird aufgeführt, dass Proben vom Trinkwasser innerhalb eines Tages zum Labor gebracht werden sollten, spätestens aber am zweiten Tag. Die Lagerung während des Transportes sollte sonnenlichtgeschützt und gekühlt erfolgen, idealerweise bei Temperaturen von 5 ± 3 °C. Eine Kühlungsregime ist nicht genau festgelegt, d.h. die Zahl, Größe und Positionen der Eispackungen müssen entsprechend der Probenanzahl und Menge, sowie Temperatur geklärt werden. Auch die Kühlmittel sind nicht bestimmt, sondern es wird auf Beispiele, wie Eispacks oder auftauendes Eis hingewiesen. Bei einer Transportzeit, die acht Stunden überschreitet, muss die Temperatur genau aufgezeichnet werden. Ein direkter Kontakt der Kühlmittel mit dem Proben sollte vermieden werden, damit das Einfrieren der Proben ausgeschlossen werden kann. Außerdem sind Warmwasserproben von Kaltwasserproben zu trennen. Entspricht der Ansatztag dem Transporttag, können die Proben auch bei Umgebungstemperatur transportiert werden. In der Regel sollten alle Proben, vor allem aus Warmwasser, herunter gekühlt werden, so schnell wie möglich dem Labor

übergeben und möglichst sofort angesetzt werden, um die Analyseergebnisse nicht zu verfälschen [DIN EN ISO 19458, 2006].

1.4. Eigenschaften von Legionellen, die wichtig für den Einfluss des Untersuchungsergebnisses sein können

Legionellen sind gramnegative, aerobe und bewegliche Stäbchenbakterien. Sie bilden keine Sporen aus, sind durchschnittlich 2-5 µm lang und ihr Durchmesser beträgt 0,5-0,8 µm. Legionellen wachsen nur unter spezifischen Nährstoffangebot, dabei müssen vor allem L-Cystein (aus Stoffwechsel anderer Organismen) und Eisenverbindungen vorhanden sein, aber auch Calcium- und Magnesiumionen sind wichtig, weswegen Legionellen in weichen Wasser nur schlecht wachsen [URL-4]. Die Organismen vermehren sich sehr gut an Kunststoffoberflächen bzw. Gummioberflächen, wie Ventilen und Dichtungen. Sie vermehren sich vorzugsweise in Warmwasser mit langen Stehzeiten, wie bei Boilern und Warmwasserleitungen. Bei der Bewertung der Verunreinigung durch Legionellen sollte immer in Betracht gezogen werden, dass diese sich auch nicht nur schwimmend in den Warmwassersystemen bewegen, sondern auch eine lokale Kontamination erfolgt, z.B. am Perlator des Wasserhahns [URL-3].

Das Verhalten der Keime bei verschiedenen Temperaturen spiegelt sich wie folgt wider: Bis 20 °C erfolgt in der Regel kein weiteres beträchtliches Wachstum der Keimzahl, das geschieht langsam ab 20 °C. Ihr optimales Wachstumsverhalten besitzen sie bei 30 °C bis 45 °C und können darüber hinaus im Gegensatz zu anderen Keimen auch gut wachsen. Ab 50 °C wird das Wachstum jedoch stark eingeschränkt und ab 55 °C beginnt eine verzögerte Abtötung, die ab 62 °C sehr schnell geschieht. Ab 70 °C wird eine Desinfektion erreicht (nach dreiminütiger Einwirkzeit). Legionellen sind in der Lage, sich in Biofilmen und Protozoen zu integrieren (sowie deren Dauerformen). Sie werden dabei nicht verdaut, sondern vermehren sich sogar noch. Durch dieses Verhalten sind sie auch lungengängig, was ihre Pathogenität deutlich steigert [URL-1]. Legionellen benötigen Aminosäuren, die im Wasser nicht ausreichend vorhanden sind, diese finden sie aber reichlich in Amöben, weswegen sie sich dort bevorzugt vermehren. Durch die Cystenausbildung der Amöben überleben sie sogar Desinfektionsmaßnahmen, wie z.B. durch Chlor [URL-2].

1.5 Legionellendiagnose

Zur quantitativen Bestimmung von Legionellen wird zum einen die Membranfiltration und zum anderen der Direktansatz durchgeführt. Beim Direktansatz wird ein definiertes Volumen auf GVPC-Festmedium (Glycin-Vancomycin-Polymyxin-Cycloheximid-Medium) pipettiert und anschließend mit einem sterilen Einmaldrigalskispatel homogen auf der Oberfläche der Platte ausgestrichen. Bei der Membranfiltration wird ein definiertes Probenvolumen in einen sterilen Trichter gegossen, an dessen Ende ein Membranfilter befestigt ist. Anschließend wird durch eine Vakuumpumpe das Wasser abgesaugt. Nachfolgend kann auch eine Säurebehandlung mit Spülung durchgeführt werden. Die Säurebehandlung erfolgt mit Legionellensäurepuffer und dient der Dezimierung von unerwünschter Begleitflora und wird üblicherweise bei Proben mit vermutlich hoher Keimzahl verwendet (Hitzebehandlung mit 50 °C nicht zulässig bei Trinkwasserproben). Gespült wird mit demineralisiertem Wasser, um die Pufferrückstände zu entfernen. Optional kann eine Spülung mit 100 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung durchgeführt werden, um die festsitzenden Legionellen des Trichters durch den Filter zu spülen. Durch die geringe Porengröße der Membran, bleiben die Legionellen an dieser haften. Die Membran wird mit einer vorher abgeflamten Pinzette luftblasenfrei auf ein GVPC-Medium aufgelegt. Durch die Poren können die Organismen nun die Substanzen des Medium aufnehmen und überschüssige oder letale Stoffwechselprodukte in das Medium wieder zurückbringen. Nach Beendigung des Arbeitsvorgangs werden die Platten bei 36 °C im Brutschrank inkubiert und dreimal in einen Zeitraum von 7-10 Tagen ausgewertet. Verdächtige Kolonien haben meistens eine Uhrglas-förmige Erscheinung und sind glänzend grau, gelblich mit scharfen Rand. Zur qualitativen Bestimmung werden Exemplare jeder morphologisch unterschiedlich erscheinenden, verdächtigen Kolonie auf BCYE-Medium (Buffered Charcoal Yeast Extract-Medium) und auf Blutagar überimpft. Das Ausbleiben des Wachstums auf Blutagar und das Wachstum auf BCYE-Medium sind die Identifikationsnachweise für die Gattung *Legionella*. Zur Bestimmung der Serogruppen kann der Latextest angewendet werden [*Nachweis von Legionellen in Wasserproben*, 2013].

1.6 Vorgehensweise für die Bachelorarbeit

Um reproduktive Experimente mit gleichen Bedingungen zu schaffen, werden Voruntersuchungen durchgeführt. Dafür werden zuerst der Umgang und das Herstellen einer Grundlösung praktiziert, welche das Wasser oder Gewässer darstellen soll, aus dem die Probennahme erfolgt. Des Weiteren dienen die Voruntersuchungen der Festlegung des Filtrationsvolumens, da noch nicht klar ist, wie viel Legionellen tatsächlich in der Kryokultur überlebt haben. Da in realem Wasser zu viel Begleitflora vorhanden ist und die Konzentrationen der Legionellen schwanken, werden *Legionella pneumophila* Kryokulturen verwendet, bei der die Keimzahl zum Zeitpunkt des Einfrierens bekannt ist. Aufgrund dieser Zahl werden entsprechende Verdünnungsschritte und Pipettivolumina ausgerechnet, um selbst definierte Legionellenkonzentrationen zu erhalten. Diese sollen zum einen beim technischen Maßnahmegrenzwert von 100 KBE/100 ml liegen (Grenzwertkonzentration, GK) und zum anderen in einem deutlich höheren Konzentrationsbereich (zwischen 1000 und 10000 KBE/100 ml (höhere Konzentration, HK)). Diese Ausgangskonzentrationen werden bei jedem Versuch miteinander verglichen und bilden durchnummerierte Arbeitspakete (AP), bei denen die Durchführungsbedingungen so gut wie möglich gleich gehalten werden, jedoch verschiedene Variablen des Probentransportes, wie die Ausgangstemperatur, verändert werden. Eine Übersicht für die einzelnen Experimente, sowie Ergebnisdiagramme werden im Anhang aufgeführt. Die farblich markierten Pakete wurden nicht durchgeführt (AP 5 nur mit realer Probe angesetzt) und wären Möglichkeiten für zukünftige Untersuchungen. Abbildung 27 zeigt den unterschiedlichen Temperaturverlauf bei unterschiedlicher Anzahl Kühlakkus. Arbeitspaket 7 wird als Standardarbeitspaket angesehen, weil dieses dem realen Transport am nächsten kommt (4 Kühlakkus, nach 8 h Kühlzelle, 45 °C Ausgangstemperatur). Daher werden einige Versuche mit besonderen Bedingungen ähnlich wie AP 7 gehandhabt und damit verglichen.

Die mit Leitungswasser gefüllten und autoklavierten 1000 ml großen Glasflaschen werden entsprechend beimpft, homogenisiert (per Hand und mit Schüttelinkubator) und auf die gewünschte Ausgangstemperatur durch ein Wasserbad gebracht. Zuallererst werden Vorversuche stattfinden, um die Reproduzierbarkeit und Arbeitsvolumina für die Hauptuntersuchungen festzulegen. Nach Festlegung der Volumina werden

entsprechend die Hauptversuche unternommen. Die Simulation des Probentransportes wird im Labor mit Transportboxen (siehe Abbildung 4) und Probenflaschen durchgeführt. Dabei werden Temperaturen und Zeiten aufgezeichnet. Zu den bestimmten Transportzeiten werden Ansätze durchgeführt, um die zu diesem Zeitpunkt vorhandene Keimzahl zu bestimmen. Als experimentelle Variablen dienen neben der Transportzeit, Ausgangskonzentration und Ausgangstemperatur auch die Transporttemperatur, die damit verbundene Anzahl der Kühlakkus, die Lagerung in der Kühlzelle und besondere Versuchsbedingungen, wie der Chlorgehalt. Als Masterfaktoren, die den größten Einfluss auf das Legionellenwachstum haben, werden zum einen die Temperatur und zum anderen die Verweilzeit in der Probe angesehen. Des Weiteren werden Einflussfaktoren untersucht, wie die Umgebungstemperatur und die Handhabung der Probenflaschen, sowie das periodische Öffnen der Transportbox und das Bestücken mit weiteren Probenflaschen. Außerdem werden Einflüsse auf die mikrobiologische Analyse untersucht. Es wird unter anderen gezeigt, inwiefern die Spülung und Behandlung mit Säure Auswirkungen hat. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitspakete werden zum Schluss verglichen und ausgewertet.



Abbildung 4: Styroporboxen für Simulation des Probentransportes

1.7 Statistische Grundlagen für mikrobiologische Analysen

Bei den Versuchen dieser Bachelorarbeit wird ausschließlich auf Auszählverfahren von Kolonien auf Agar-Platten zurückgegriffen. Es wird also mit der Lebendzellzahl gearbeitet, die anhand von Koloniezahlen bestimmt werden, die wiederum durch einzelne vermehrungsfähige Bakterien durch Teilung entstehen. In der Mikrobiologie

werden also statistische Daten auf Grundlage von lebenden Organismen erstellt. Diese entwickeln sich unterschiedlich, können schon im letalen Zustand oder inaktiv sein, wodurch sie sich nicht mehr vermehren. Außerdem befinden sie sich in gegenseitiger Konkurrenz um Nährstoffe und Platz auf dem Medium und verhalten sich in der Grundlösung nicht wie eine ideal homogene Lösung, da sie auch in Zellverbänden leben. Es muss also mit großen Schwankungsbereichen und einer hohen Variabilität der Ergebnisse gerechnet werden. Diese sind zum einen naturbedingt und damit unvermeidbar und zum anderen verursacht durch technische Fehler, die jedoch gering wie möglich gehalten werden sollten. Um die Größe des Schwankungsbereiches festzustellen, werden Bestimmungen an einer Probe mehrmals unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Werte werden gemittelt, um das wahrscheinlichste Ergebnis zu bestimmen, das bedeutet, dass die Anzahl der Bestimmungen sich positiv auf die Genauigkeit der Ergebnisse auswirkt. Zur Einschätzung der möglichen üblichen Abweichungen werden Standardabweichungen berechnet. Je kleiner diese sind, umso höher war die Präzision beim mikrobiologischen Arbeiten. Wenn die Ergebnisse der Bestimmungen näherungsweise übereinstimmen, wird eine Reproduzierbarkeit erreicht. Abzugrenzen von der Variabilität sind Systematische Fehler, die Ergebnisse einseitig vom wahren Wert nach oben oder unten verschieben. Dies kann z.B. an nicht ausreichend homogenisierter Biomasse liegen bzw. an Justier- oder Eichfehler von Pipette und technischen Geräten. Normalerweise wird davon ausgegangen, dass aus jeder vermehrungsfähigen Zelle eine Kolonie entstehen wird, was jedoch nicht stimmt und systematische Fehler verursacht. Eine ideale Bebrütungsdauer ist notwendig, um alle vorhandenen Kolonien zu zählen, die wachsen könnten und das Verschmelzen von Kolonien zu vermeiden. Für statistisch relevante Ergebnisse sollten die Agarplatten zwischen 30 und 300 Kolonien besitzen, optimal wäre der Bereich von 100 bis 200 Kolonien, da hierbei genug Kolonien gewachsen sind, damit die Präzision ausreichend ist und nicht zu viel gewachsen sind, um systematische Auszählfehler zu vermeiden. Jedoch ist eine Koloniezahl von ca. 100 Kolonien angestrebt, da sich die Legionellen auch deutlich vermehren könnten und Kolonien auf Platten nur bis 200 KBE auszählbar sind. Die Koloniezahlen auf Platten einer und derselben Probe sind poissonverteilt, da die Kolonien zufällig auf der Platte verteilt sind und sich unabhängig voneinander entwickeln [Bast, 1999].

Da der Schwankungsbereich wahrscheinlich zu groß sein wird und die statistische Genauigkeit wegen Einschränkungen durch Materialkosten und Aufwand eingeschränkt ist (nur Doppelbestimmungen, siebenfache Ansätze wären statistisch sicherer), wird anhand einer selbst durchgeführten Wiederholungsserie ein und derselben Probe eine zehnfache Bestimmung durchgeführt, anhand derer die Standardabweichung für die durchgeführten Versuche ermittelt wird. Diese wird in einen prozentualen Schwankungsbereich um den Mittelwert umgerechnet. Alle Werte die in diesem Bereich liegen sind nicht aussagekräftig, da diese nur zufällig entstanden sein könnten. Alle die darunter oder darüber liegen sprechen für eine relevante Dezimierung oder Vermehrung der Legionellen.

2 Zielstellung

Ziel der Bachelorarbeit ist es, die Einflüsse des Probentransportes auf die Ausgangskonzentration von Legionellen zu zeigen, damit eine Datengrundlage der bestehenden DIN EN ISO 19458 zur Probennahme für mikrobiologische Untersuchungen zu schaffen, sowie mögliche Neuerungen für die Probennahme, Transport und Lagerung einzuführen. Eine genaue und exakte Bestimmung der Legionellenanzahl von Trink- und Badewasser ist notwendig, um das Ausmaß einer Kontamination, besonders der gefährlichen Art *Legionella pneumophila*, aufzuweisen und diese mit geeigneten Mitteln bekämpfen zu können. Darum soll der Probentransport möglichst so stattfinden, dass die Anzahl der Organismen nicht beeinflusst wird, welches die Voraussetzung für jede Probenahme ist. Es soll mit verschiedenen Einflussfaktoren experimentiert werden, die primär die Konzentration der Legionellen und damit das Untersuchungsergebnis beeinflussen, wodurch die Sicherheit des Nachweisverfahren beeinträchtigt und das abgeschätzte Risiko als zu niedrig oder zu hoch eingestuft wird. Dafür werden unter anderen die Temperatur, Transportzeit und Ausgangskonzentration der Legionellen, sowie weitere Parameter, wie die Spülung bei der Filtration untersucht. Nach der Bebrütungszeit soll dann die Anzahl der Kolonien ausgezählt werden, um Rückschlüsse und Vergleiche zwischen den einzelnen Arbeitspaketen zu erzielen und damit die Letalität und eventuelle Vermehrungsschübe der Legionellen zu zeigen. Durch all dies wird auch die Problematik geklärt, inwiefern lange Transportstrecken Auswirkungen auf die Untersuchungsergebnisse haben und welche Rolle dafür zentrale Laborstandorte in Deutschland spielen.

3 Material

In diesem Kapitel werden alle Chemikalien, Medien, molekularbiologischen Reagenzien, sowie Materialien und Geräte aufgeführt.

3.1 Chemikalien

- KCl (Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Lot: K43406136, 99,5 %)
- HCl (VWR International S.A.S. (Briare, Frankreich), Lot: 09D270503, 32 %)
- KOH (Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Lot: B0748833 216, 99,5 %)
- NaCl (Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Lot: K43628504 230, 99,5 %)

3.2 Lösungen

- demineralisiertes Wasser, steril
- 1,49 % KCl-Lösung
- 1,74 % HCl-Lösung
- 5,61 % KOH-Lösung
- 0,90 % NaCl-Lösung
- sterile Ringerlösung hergestellt mit einer Ringertablette (1640 mg) (Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)) je 500 ml demineralisiertes Wasser
- NaClO-Lösung (ca. 13 % aktives Chlor) (neoLab GmbH (Heidelberg, Deutschland))

3.3 Medien

- GVPC-Agar (Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland))
- Nutrient-Suspension:
 - Pepton 5,0 g
 - Fleischextrakt 15,0 g
 - demineralisiertes Wasser 1000 ml
- Non-Nutrient-Agar (NN-Agar):
 - Agar 15 g
 - demineralisiertes Wasser 1000 ml
- 1 l Legionellensäurepuffer pH 2,2:
 - 865 ml KCl-Lösung 0,2 M
 - 135 ml HCl-Lösung 0,2 M

- pH 2,2 (1 M KOH-Lösung)
- Hefeextrakt-Suspension:
 - Hefeextrakt 10,0 g
 - L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat 0,4 g
 - Eisen(III)-Pyrophosphat 0,25 g
 - demineralisiertes Wasser 1000 ml
 - pH 6,8

3.4 Molekularbiologische Reagenzien

- Kryokultur *Legionella pneumophila* (Keimzahl zum Zeitpunkt des Einfrierens: 6×10^6 bis 1×10^7 KBE/ml (DSMZ 7513, Serogruppe 1, hergestellt von synlab Umweltinstitut GmbH Stollberg)
- Stammkultur *Escherichia coli* (Futterbakterien für Amöben, Stamm K12 (DSMZ 498), aus Ringversuch)

3.5 Material

- Filtereinheit (Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland))
- Saugflasche 5000 ml mit Büchnernutsche (Schott Duran AG (Wertheim/Main, Deutschland))
- Membranfilter EZ-Pak (EZ für easy) aus Cellulosenitrat, Porengröße 0,45 μm (Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland))
- Kühlakkus EZetil iceAKKU, 220 g (IPV - Inheidener Produktions- u. Vertriebsgesellschaft mbH (Hungen-Inheiden, Deutschland))
- 200 ml Probenahmeflaschen aus Polypropylen (aqua Laborservice e.K. (Wertheim, Deutschland)) (Material)
- 100 ml Probenahmeflaschen aus Polyethylenterephthalat (IDEXX GmbH (Ludwigsburg, Deutschland))

3.6 Geräte

- Sicherheitswerkbank EF/6 EC (Clean Air Techniek B.V. (Woerden, Niederlande))
- Brutschrank ICE 400-800 36 °C (Memmert GmbH 2 Co.kg (Schwabach, Deutschland))

- Vakuumpumpe WP62 220 50 (Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland))
- Lupe Colony Counter, 6-8fache Vergrößerung (IUL Instruments GmbH (Königswinter, Deutschland))
- Ultraschallwasserbad SONOREX (Bandelin electronic GmbH & Co.KG (Berlin, Deutschland))
- Schüttelinkubator Multitron (infors AG (Bottmingen, Schweiz))
- Temperaturmessgerät Digital Thermo (TFA Dostmann GmbH & Co. KG (Wertheim-Reicholzheim, Deutschland))
- pH-Messgerät MultiLine P3 (WTW GmbH (Weilheim, Deutschland))
- Dampfsterilisator Varioklav 400 EH (H+P Labortechnik GmbH (München, Deutschland))
- Photometer-System CheckitDirect für Chlor (Tintometer GmbH (Dortmund, Deutschland))
- Fluoreszenzmikroskop Olympus Cx40 (Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland))

4 Methoden

Im Folgenden ist das methodische Vorgehen zur Lösung des Ausgangsproblems aufgeführt. Alle Ansätze wurden doppelt ausgeführt, um statistisch aussagekräftiger zu sein. Alle Medien wurden nach dem Beimpfen für sieben Tage in den Brutschrank bei 36 °C gelagert und dann ausgewertet. Die Vorversuche zur zehnfachen Bestimmung und Kontrolle des Inokulums wurden bei synlab Umweltinstitut GmbH Stollberg durchgeführt und anschließend wurden die Platten und Kryokulturen nach synlab Umweltinstitut GmbH Leipzig transportiert.

4.1 Herstellung der Prüflösung und Voruntersuchungen

Es wurde zuerst eine Flasche mit Legionellen im Konzentrationsbereich von 10^3 - 10^4 KBE/100 ml (HK) hergestellt. Als Basis wurde eine Kryokultur mit *Legionella pneumophila*, die zum Zeitpunkt des Einfrierens eine Zellzahl von 6×10^6 bis 1×10^7 KBE/ml besaß, verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen angefertigt (jeweils 1:10), bei denen 1 ml Kryokultur zu 9 ml NaCl-Lösung bis zum Verdünnungsschritt von 10^{-2} pipettiert wurden ist. In dieser Verdünnung befinden sich demnach theoretisch 6×10^4 bis 1×10^5 KBE/ml. 100 µl der Verdünnung wurden zu 500 ml sterilen Leitungswasser gegeben. Im Verhältnis von 1:5000 ergibt das 12-20 KBE/ml. Die Flasche wurde gut geschüttelt und zwei Direktansätze durchgeführt, wobei jeweils 1 ml auf zwei GVPC-Medien zu 0,5 ml aufgeteilt wurde. Außerdem wurde zehnmal 10 ml Membranfiltrationen durchgeführt (120-200 KBE/10 ml). Anschließend wurden die Nährbodenplatten im Brutschrank bei 36 °C gelagert.

Analog erfolgte die Herstellung einer zweiten Flasche für den Konzentrationsbereich, der um den Grenzwert bei 100 KBE/100 ml (GK) liegt. Dazu wurde eine zusätzliche Verdünnungsstufe durchgeführt und 200 µl der letzten Verdünnungsstufe auf 1000 ml steriles Wasser gegeben, um das Verhältnis von 1:5000 beizubehalten. Anschließend wurden jeweils zweimal mit Filtrationsvolumen 100 ml, 50 ml, 20 ml und 10 ml filtriert.

Die Bestimmung der Keimzahl des Inokulums der Kryokultur wurde anhand eines Einzelversuches wiederholt. Dazu wurden 1:10 Verdünnungen der Kryokultur mit Ringerlösung bis zur Verdünnungsstufe von 10^{-4} durchgeführt. Aus dieser Verdünnung

wurden zweimal 100 µl auf ein GVPC-Medium pipettiert. Analog wurde auch für eine höher vermutete Konzentration vorgegangen. Hierbei wurde aus der 10^{-3} Verdünnung 2 ml zu 9 ml Ringerlösung gegeben, damit das doppelte Volumen erreicht wird.

4.2 Ansetzen der Wasserproben

Nach Auswertung der Vorversuche wurden die Volumina zur Herstellung der Prüflösungen von Arbeitspaket 2, 3 und 4 festgelegt. Analog, wie bei 4.1. wurden Verdünnungsreihen angefertigt. Aus der ersten Verdünnung wurden 200 µl in 1000 ml steriles Leitungswasser gegeben (Konzentrationsbereich von $10^3 - 10^4$ KBE/l) und aus der zweiten Verdünnungsstufe 200 µl in 1000 ml Wasser gegeben (Konzentration um 10^3 KBE/l). Die Flaschen wurden anschließend für 45 min im Schüttelinkubator bei 100 min^{-1} homogenisiert und die Flaschen der Arbeitspakete 3 und 4 wurden für 15 min in ein 45°C heißes Wasserbad gestellt.

Für die restlichen Arbeitspakete wurden die Volumina so geändert, dass mehr Kolonien auf den Platten wachsen. Dabei wurde für die Arbeitspakete 6-13 und 15, 17, 18, 21, 24 und 25 für die HK 600 µl der 10^{-2} Verdünnung in steriles Wasser (1 l) pipettiert und für die GK 600 µl aus der 10^{-3} Verdünnung pipettiert. Bei Arbeitspaket 14 wurden 600 µl der 10^{-1} -Verdünnung genommen. Die fertigen Prüflösungen wurden bei 45°C im Schüttelbrutschrank zur Homogenisierung für 45 min gestellt und anschließend für 15 min in 45°C heißes Wasserbad. Die Flaschen des Arbeitspaketes 13 wurden bei Raumtemperatur stehen gelassen und die von Arbeitspaket 15 bei 55°C ebenfalls für 15 min in das Wasserbad gesetzt.

Nach Fertigstellung der verschiedenen Prüflösungen und Bestimmung des 0 h Wertes wurden die Prüflösungen gleichmäßig auf Probenflaschen aufgeteilt. Bei allen Untersuchungen wurde zusätzlich eine Flasche mit Leitungswasser in das Wasserbad gestellt. In dieser wurde ein Temperaturmessgerät eingeführt, um die Temperatur zu verfolgen. Die Flasche wurde dann zusätzlich in die einzelnen Transportboxen für Temperaturaufzeichnungen gestellt.

Für Arbeitspaket 23 wurden unterschiedliche Füllmengen der Probenflaschen realisiert, dazu wurden vier Flaschen des HK-Bereiches nach gleichen Bedingungen hergestellt, wie zuvor. Da 1000 ml für die Füllmenge von 150 ml und 200 ml der jeweils acht

Probenflaschen nicht ausreicht, wurden zwei 1000 ml Flaschen genutzt und die Menge gleichmäßig aufgeteilt auf die Flaschen, sodass von beiden Flaschen der gleiche Anteil genutzt wurde.

4.3 Simulation des Probentransportes

4.3.1 Ansetzen von Arbeitspaket 2, 3 und 4

Nach Fertigstellung der Prüflösungen für alle die Arbeitspakete 2, 3 und 4 wurde gleich im Anschluss danach für die GK doppelte Membranfiltrationen mit 20 ml durchgeführt und die HK ein doppelter Direktansatz ausgeführt mit jeweils 0,5 ml. Die Platten entsprechen dem 0 h-Wert der Arbeitspakete. Zur Simulation des Probentransportes wurde der restliche Inhalt der Prüflösungen in sterile Probenflaschen gleichmäßig aufgeteilt und eine zusätzliche Flasche mit normalem Leitungswasser unter gleichen Temperaturbedingungen verwendet. Diese wurde zur Messung der Transporttemperaturen verwendet. Die Probenflaschen der drei Arbeitspakete wurden jeweils in eine Transportbox aus Styropor gestellt, wobei bei Arbeitspaket 4 zusätzlich vier Kühlakkus hinein gelegt wurden. Die Boxen wurden verschlossen und bei Raumtemperatur von ca. 20 °C ruhen gelassen. Nach 8 h, 24 h und 48 h wurden aus den jeweiligen Probenflaschen wieder Ansätze durchgeführt, analog zum 0 h-Ansatz. Außerdem wurden die Kühlakkus nach 8 und 24 h ausgetauscht.

4.3.2. Ansetzen von Arbeitspaket 6, 7 und 8

Ab Arbeitspaket 6 wurden für alle Ansätze Membranfiltrationen mit 100 ml bei der GK und 10 ml bei der HK durchgeführt.

Nach Ansetzen der ersten 0 h-Werte wurden die Probenflaschen in Kühlboxen gestellt und mit vier Kühlakkus versehen. Nach 2 h wurde der nächste Ansatz durchgeführt und die Flaschen von Arbeitspaket 6 in die Kühlzelle bei 5,5 °C gestellt. 8 h später wurden die nächsten Ansätze durchgeführt und die Kühlakkus von Arbeitspaket 8 erneuert. Die Flaschen von Arbeitspaket 7 wurden in die Kühlzelle gestellt. 24 h später wurden erneut Ansätze durchgeführt und die Flaschen des Arbeitspaketes 8 in die Kühlzelle eingelagert. Die letzte Bestimmung erfolgte nach 48 h. Für die Probenflaschen in der Kühlzelle wurde im Zyklus von 15 min eine Temperaturaufzeichnung vorgenommen.

4.3.3. Ansetzen von Arbeitspaket 9, 11 und 13

Bei Arbeitspaket 9, 11 und 13 wurden Besonderheiten für die Probenflaschen eingeführt. Nach Ansätzen der ersten Proben wurden analog zu den anderen Arbeitspaketen wieder Ansätze nach 2, 8, 24 und 48 h durchgeführt. Bei Arbeitspaket 9 wurden die Probenflaschen in den Brutschrank bei 36 °C gestellt. Die Probenflaschen des Arbeitspaketes 11 wurden mitsamt Transportbox und 4 Kühlakkus in den Brutschrank bei 36 °C gestellt. Nach Ansetzen des 8 h-Wertes wurden die Flaschen der Box in die Kühlzelle bei 5,5 °C eingelagert. Die Probenflaschen des Arbeitspaketes 13 wurden bei Raumlicht und Raumtemperatur außerhalb der Transportbox stehen gelassen.

4.3.4 Ansetzen von Arbeitspaket 12

Nach Fertigstellung der Prüflösungen für AP 12 wurde diese mittels Wasserbad auf 45 °C gebracht und in die Probenflaschen abgefüllt. Die Flaschen der unterschiedlichen Konzentrationen wurden jeweils einer Transportbox zugeteilt, sowie eine extra Flasche für Temperaturmessungen pro Box. Die Ansätze erfolgen zum Zeitpunkt von 0, 2, 8, 24 und 48 Stunden. Dabei wurden in beide Boxen aller 60 min eine zusätzliche Probenflasche mit einfachem Leitungswasser gestellt. Diese wurden vorher 15 min in 45 °C heißes Wasserbad gesetzt. Nach 8 h wurden die Flaschen in die Kühlzelle bei 5,5 °C eingelagert.

4.3.5 Ansetzen von Arbeitspaket 10, 14 und 15

Für Arbeitspaket 10 wurden die 16 Probenflaschen ein paar Tage vorher in die Kühltruhe bei -25 °C gelegt, danach wurde die Prüflösung auf die gekühlten Probenflaschen verteilt, die dann in die Transportbox kamen. Die Arbeitspakete 10, 14 und 15 wurden mit vier Kühlakkus bestückt und wurden nach 8 h in die Kühlzelle gestellt. Die Ansätze für Arbeitspaket 14 wurden als doppelter Direktansatz mit 0,5 ml durchgeführt.

4.3.6 Ansetzen Arbeitspaket 24 und 25

Die Ausführung der Pakete erfolgte analog zu Arbeitspaket 7, nur das bei AP 24 statt der üblichen 200 ml Probenflaschen aus Polypropylen, 100 ml Probenflaschen aus

Polyethylenterephthalat verwendet wurden. Für AP 25 wurde statt der vier Kühlakkus Crush-Eis gleichmäßig in der Transportbox verteilt, sodass alle Proben von Eis umhüllt waren.

4.4 Weitere Einflussmöglichkeiten

4.4.1 Einfluss von Legionellensäurepuffer und verschiedenen Chemikalien

Die fertigen Prüflösungen wurden direkt für die Membranfiltrationen verwendet. Es wurden 10 Filtrationen mit jeweils 100 ml durchgeführt, wobei bei der Flasche der höheren Konzentration 10 ml filtriert wurden. Anschließend wurden jeweils die ersten beiden Membranen unbehandelt auf das Medium aufgelegt. Die nächsten beiden Filtereinheiten wurden für 5 min mit 20 ml Legionellensäurepuffer überschichtet. Die kommenden zwei Filter wurden mit 100 ml bzw. 10 ml NaCl-Lösung gespült. Weitere zwei Filter wurden mit 10 ml demineralisierten Wasser gespült und die letzten beiden Filter wurden mit jeweils 100 und 10 ml Ringerlösung gespült.

4.4.2 Einfluss des Chlorgehaltes

Für den Einfluss von Chlor auf die Legionellen, wurden neben den normalen Chlorgehalt des Leitungswassers, jeweils zwei höhere Konzentrationen an Chlor untersucht. Dafür kamen zum einem ein Gehalt von 0,6 mg/l zum Einsatz, welches dem Sollwert der Konzentration von freiem Chlor im Beckenwasser entspricht und zum anderen einen Gehalt von 1,2 mg/l, welches dem höchstmöglichen Wert an freiem Chlor im Beckenwasser entspricht, zum Einsatz [DIN 19643-1, 2012]. Die Bestimmung des Chlorgehaltes des Leitungswassers erfolgte über das Photometer-System CheckitDirect. Damit wurde ein Gesamtchlorgehalt von 0,05 mg/l gemessen. Für diesen Wert wurde als Referenz Arbeitspaket 7 verwendet. Um die höheren Chlorkonzentrationen zu erhalten wurden aus einer 1:1000 Verdünnung von Natriumhypochloritlösung einmal 4,6 ml (AP 17) und einmal 9,2 ml (AP 18) in die Prüflösungen pipettiert (sowohl GK als auch HK). Die Lösungen wurden mit dem Photometer-System überprüft, ob die gewünschten Chlorkonzentrationen erreicht wurden. Die Herstellung der Lösungen erfolgte analog, wie bei AP 7.

4.4.4 Einfluss der Füllmenge der Probenflasche

Bei Arbeitspaket 23 wurden verschiedenen Füllmenge realisiert und nur eine Ausgangskonzentrationsbereich der HK durchgeführt, da bei 50 ml Füllmenge nicht 100 ml filtriert werden kann. Es wurden nach Ansätzen des 0 h-Wertes, jeweils 8 Probeflaschen mit 50 ml, 150 ml und 200 ml abgefüllt. Die Flaschen jedes Füllvolumens wurden in drei unterschiedliche Transportboxen mit 4 Kühlakkus gestellt und nach 8 h in die Kühlzelle. Ansätze wurden nach 2, 8, 24 und 48 h durchgeführt.

4.5. Versuche mit nährstoffreichen Wässern

4.5.1 Überprüfung des Verhaltens von Legionellen in realem Warmwasser

Hierfür wurden Proben eines kontaminierten Objektes der Stadt Leipzig verwendet, in dem zuvor bis zu 200 KBE/100 ml in der Zirkulation nachgewiesen wurde. Die Stelle wurden beprobt ohne zu desinfizieren und drei 1000 ml Glasflaschen, sowie eine 500-ml-Flasche befüllt. Die Temperatur wurde bestimmt und ergab 51,5 °C. Die Proben wurden umgehend ohne Kühlung zum Labor transportiert. Zwei der 1000-ml-Flaschen wurden mit einem Magnetrührer in einem 5000-ml-Messbecher homogenisiert. Anschließend wurde zehnmal 20 ml daraus filtriert, um eine Mehrfachbestimmung durchzuführen. Anschließend wurde die Restmenge auf 48 Probeflaschen aufgeteilt. Jeweils acht Flaschen wurden als Versuchsserie zusammengefasst. Eine Serie Flaschen wurde bei 36 °C im Brutschrank gelagert, zwei andere wurden bei Raumtemperatur ohne Box bzw. mit Box (nach 16 h Kühlzelle) stehen gelassen. Die drei letzten Serien wurden in einer Box mit vier Kühlakkus gelagert. Eine Serie davon wurde nach 2 h, die andere nach 16 h in die Kühlzelle gestellt. Die letzte Serie wurde in der Box belassen und die Kühlakkus nach 16 h und 24 h ausgetauscht. Ansätze wurden nach 1 h, 2 h, 16 h, 24 h und 48 h durchgeführt, wobei der 8 h-Ansatz aus organisatorischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte.

4.5.2 Qualitativer Nachweis von Amöben

Um den Einfluss von Amöben auf den Transport von Legionellen zu klären, wurde von den Wasserproben aus dem realem System ein qualitativer Nachweis laut QM-Arbeitsanweisung durchgeführt. Dafür wurden zuerst eine Nutrient-Suspension und

NN-Agar hergestellt und autoklaviert. Mit letzterem wurden in sterile Petrischale Agar Platten gegossen und in die Suspension wurde von einer *Escherichia coli* Stammkultur Biomasse überimpft. Diese wurde dann bei 36 °C für 24 h bebrütet. Nach 24 h wurden dann jeweils 50 µl Bakteriensuspension auf fünf NN-Platten pipettiert und ausgestrichen. Für die Bestimmung der Amöben wurde eine fraktionierte Membranfiltration durchgeführt. Dazu wurde für jeweils eine NN-Platte 0,1 ml, 1 ml, 10 ml, 100 ml und 1000 ml filtriert. Die Filter wurden dann mit der Oberseite nach oben mit einer sterilen Pinzette luftblasenfrei auf die NN-Medien gelegt. Die Platten wurden bei 30 °C für neun Tage inkubiert und bereits nach 48 h wurde der Filter vom Medium entfernt [Mikrobiologie QM-Arbeitsanweisung, 2008].

4.5.3 Verhalten in einer nährstoffspezifischen Suspension

Es wurde 1000 ml Hefeextrakt-Lösung, wie unter 3.3 aufgeführt, hergestellt. Die Herstellung der Lösung wurde unter Zuhilfenahme der DIN EN ISO 11731-2:2008-06 durchgeführt [DIN EN ISO 11731-2, 2008]. Die Lösung wurde analog, wie bei AP 6-13 beimpft, homogenisiert und auf 45 °C erhitzt, sowie nach Ansetzen des 0 h-Wertes auf acht Probeflaschen aufgeteilt. Ansätze wurden bei 0 h, 2 h, 8 h, 24 h und 48 h durchgeführt. Die Flaschen wurden bei 36 °C im Brutschrank gelagert.

5 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden alle Untersuchungsergebnisse dargestellt. Anhand der ermittelten Koloniezahlen wurden Mittelwerte der Doppelbestimmungen erstellt und diese prozentual abgeglichen. Die Ausgangskoloniezahlen oder 0 h-Werte werden immer als 100 % assoziiert. Die Werte werden in Abhängigkeit der Transportzeit dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete mit Fehlerbalken sind im Anhang zu finden. Im Ergebnisteil werden zur besseren Übersicht mehrere Arbeitspakete gleichzeitig und ohne Fehlerbalken dargestellt. Außerdem werden hierbei nur ganzzahlige Prozentwerte verwendet.

5.1 Auswerten der Voruntersuchung

Tabelle 1: Auswertung der Medien des Vorversuches

GVPC-Medium	Membranfiltration [KBE/10 ml]	Membranfiltration [KBE/100 ml]	Direktansatz [KBE/0,5 ml]
Platte 1	8	73	2
Platte 2	6	59	2
Platte 3	7	78	2
Platte 4	9	62	3
Platte 5	10	100	
Platte 6	12	70	
Platte 7	12	30	
Platte 8	6	90	
Platte 9	10		
Platte 10	9		
Mittelwert	8,90	70,25	2,25
Standardabweichung	2,18	21,24	
Prozentuale Abweichung vom Mittelwert	24,49 %	30,23 %	

Nach siebentägiger Bebrütung der Platten im Brutschrank konnte die gewachsenen Kolonien ausgezählt werden. Wie beispielsweise in Abbildung 6 zu sehen ist, sind hier sechs Kolonien gewachsen. Für die GK wurden alle Filtrationsvolumen auf 100 ml hochgerechnet, damit ergibt sich mit 8 Ansätzen eine durchschnittliche Koloniezahl von 70,25 (aus den Werten in Tabelle 1) mit einer Standardabweichung von 21,24, also schwanken die Koloniezahlen mit 30,23 %, um den Mittelwert. Für den Konzentrationsbereich von 10^4 - 10^5 wurde eine 10fache Mehrfachbestimmung durchgeführt, womit sich ein durchschnittlicher Wert von 8,90 ergibt. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, wurde anhand der Häufigkeit der Werte der 10fachen Mehrfachbestimmung eine Poisson-Verteilung mit einer Standardabweichung von 2,2 erstellt (die prozentuale Abweichung beträgt 24,53%). Parallel dazu wurden für diesen Konzentrationsbereich Direktansätze zur Kontrolle des Inokulums durchgeführt. Hierbei sind 2 bis 3 drei Kolonien gewachsen, zusammengerechnet für den jeweiligen Direktansatz ergibt das 4 bis 5 Kolonien auf 1 ml, erwartete wurden 12-20 KBE/ml. Die Ergebnisse für die Keimzahlbestimmung des Inokulums fielen wie folgt aus: Bei einer erwarteten Keimzahl von 60-100 KBE sind zum einem 20 KBE und zum anderen 26 KBE auf den Platten aufgewachsen. Bei der erwarteten Keimzahl von 120-200 KBE sind 37 und 27 KBE aufgewachsen.

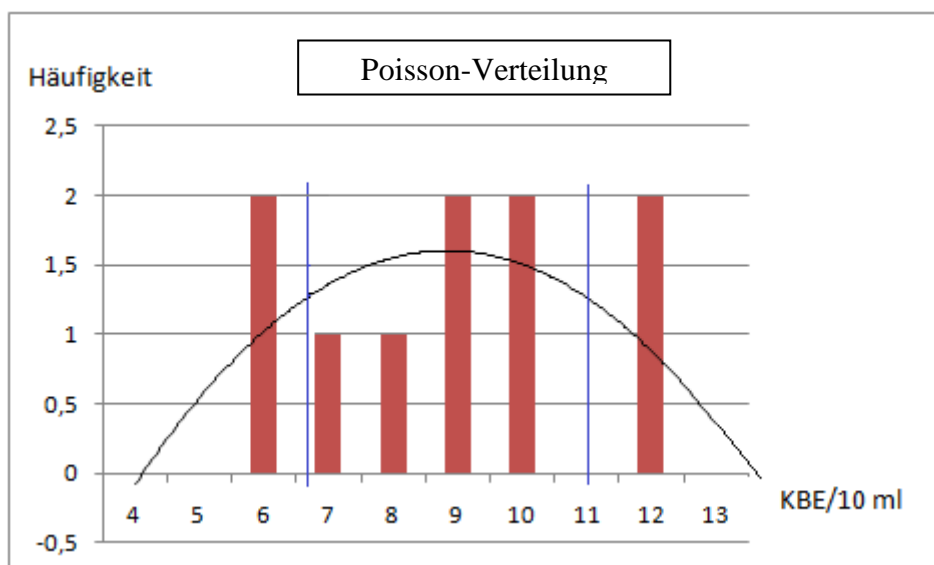


Abbildung 5: Poisson-Verteilung der Mehrfachbestimmung



Abbildung 6: Beispielplatte des Vorversuches der zehnfachen Bestimmungsreihe

5.2 Ergebnisse Arbeitspaket 2,3 und 4

In Abbildung 7 zu sehen, ist ein deutlicher Abstieg der Koloniezahlen mit steigender Transportzeit der Arbeitspakete 2, 3 und 4. Nach 48 h sind bei allen Paketen nur noch 11-15 % der Ausgangskonzentration der Legionellen vorhanden. Bei erhöhter Ausgangstemperatur liegen die Werte bei 8 h und 24 h am höchsten mit ca. 75 % bzw. 53 % und bei AP 4 ist der 2 h Wert mit 95 % noch sehr nahe an der Referenzkonzentration.

In Abbildung 8 können die Arbeitspakete bei erhöhter Ausgangskonzentration betrachtet werden. Die Punkte verlaufen weiter auseinander und die Werte steigen ab 2 h bei AP 3 und 4 erst einmal über 100 %. Die Werte für erhöhte Ausgangstemperatur liegen am höchsten mit bis zu 137 %, die der anderen zwei APs verhalten sich ähnlich, wobei die Werte von AP 4 nur bei 24 h knapp unterhalb von AP 2 liegen.

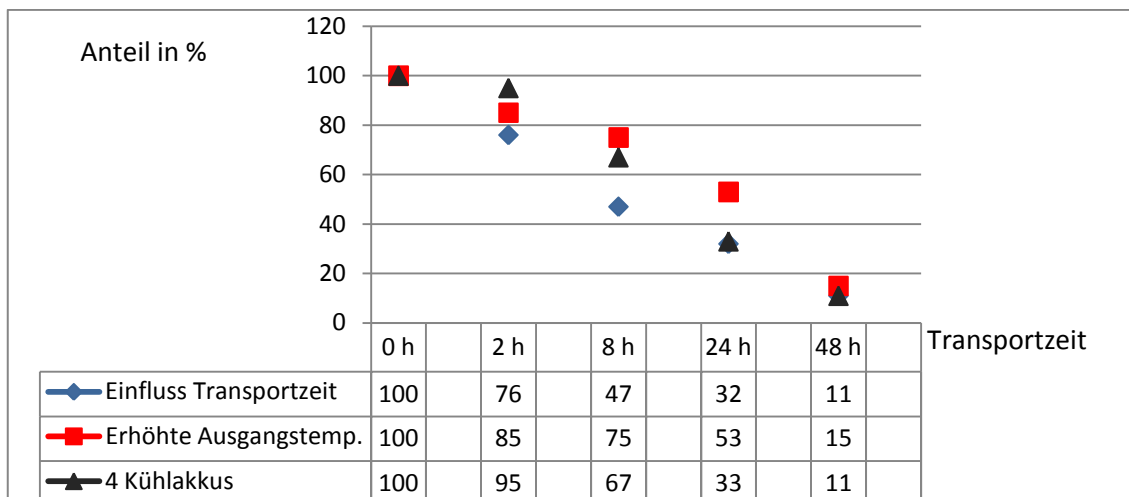


Abbildung 7: Vergleich von AP 2, 3 und 4 bei GK

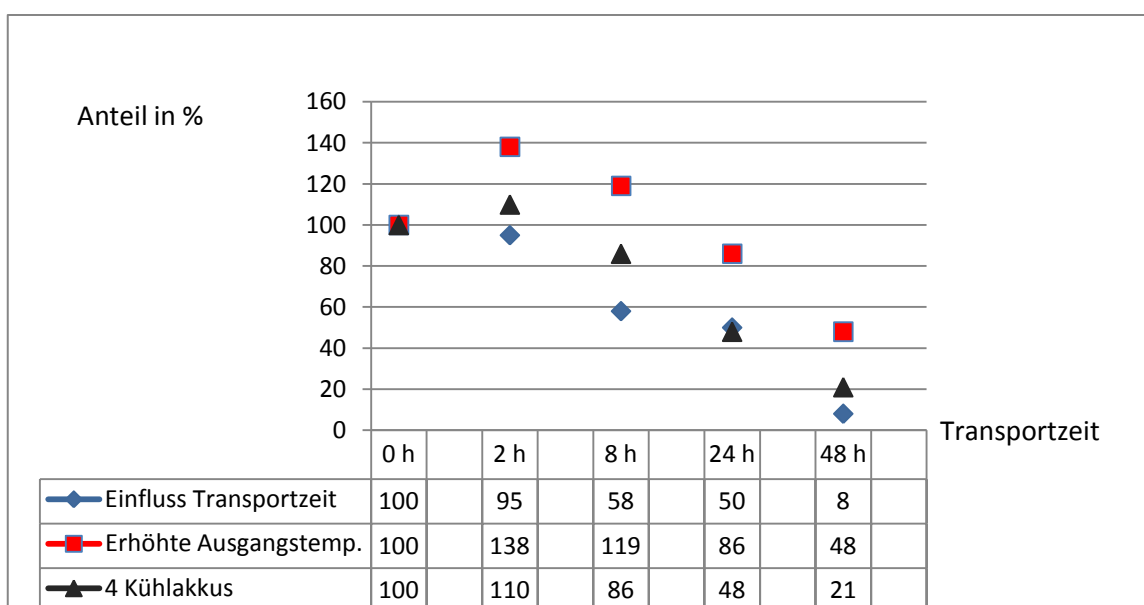


Abbildung 8: Vergleich von AP 2, 3 und 4 in der HK

5.3. Ergebnisse Arbeitspaket 6,7 und 8

In Abbildung 9 und 10 ist der unterschiedliche Keimzahlverlauf von AP 6, 7 und 8 über die Transportzeiten im Vergleich zu den unterschiedlichen Kühlzellenzeiten für die jeweiligen Konzentrationen zu erkennen. Deutlich erkennbar sind auch hier wieder sinkende Verläufe der einzelnen Punkte. Dabei liegen die Werte für 2 h Kühlzellenzeit vor allem bei 2 h und 8 h noch über 100 %. Die Koloniezahl für die 8 h Kühlzellenzeit ist jeweils 1-17 % größer als die für die 24 h Kühlzellenzeit.

Ähnlich ist es auch bei der HK, wobei hier die Punkte näher aneinander liegen und die Werte der 2 h-Kühlzellenzeit sich nicht so stark abgrenzen und am Ende auf das Niveau von Kühlzellenzeit nach 8 h fallen. Zum Vergleich wurde der beste Verlauf der ersten drei Arbeitspakete genutzt (AP 3). Dieser hat in der GK etwas höhere prozentuale Anteile der Ausgangskonzentration als die der Kühlzellenzeit nach 8 h und in der HK hat AP 3 die deutlich höchsten Anteile, die bis 8 h zwischen 120 % und 140 % liegen.

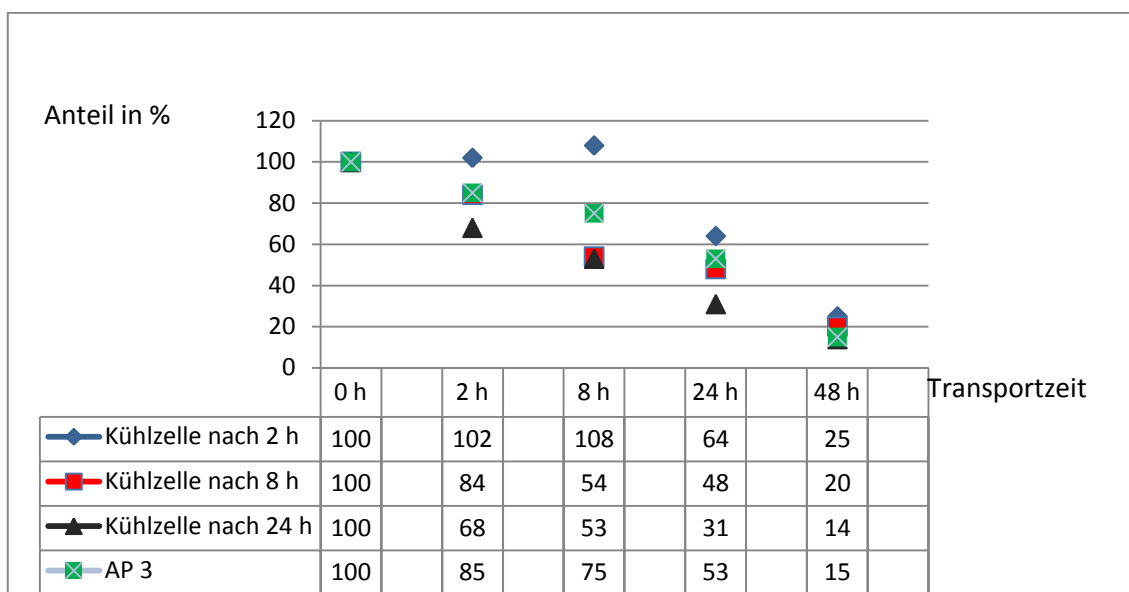


Abbildung 9: Vergleich der unterschiedlichen Kühlzeiten für die GK

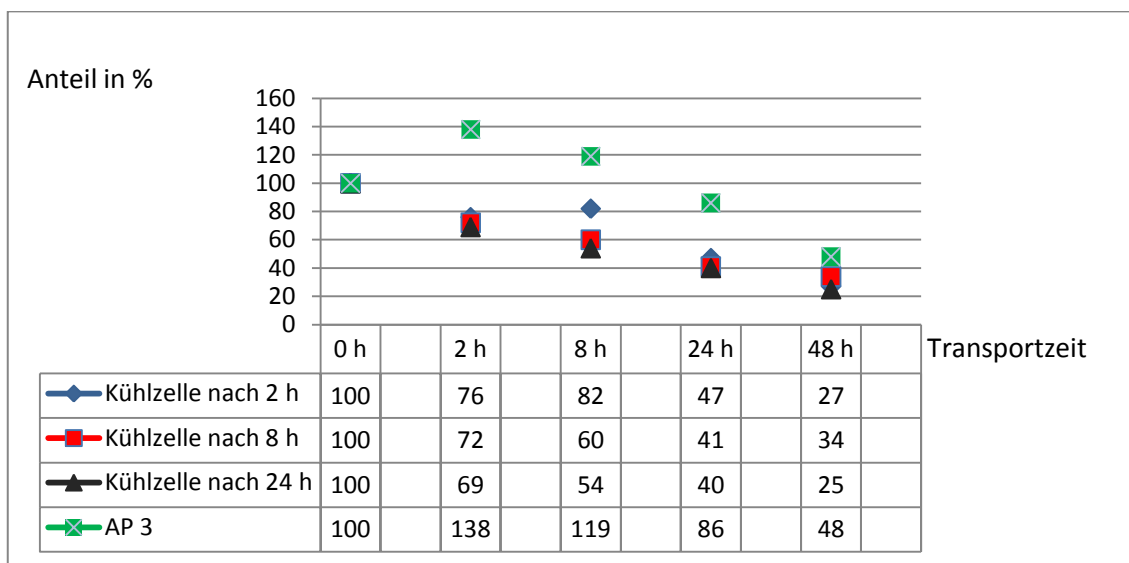


Abbildung 10: Vergleich der unterschiedlichen Kühlzeiten bei HK

5.4 Ergebnisse Arbeitspakete 9, 11 und 13

Erneut können steil sinkende Verläufe bei AP 9, 11 und 13 beobachtet werden (siehe dazu Abbildung 11 und 12). Dabei hat AP 11 nach 48 h noch die meisten überlebende Legionellen aufzuweisen mit 35% bzw. 37%. Zum Vergleich wurden die Werte von AP 2 und AP 7 mit berücksichtigt. Alle Werte liegen dicht aneinander. Über die geringsten Konzentrationen verfügen nach 48 h Stunden noch AP 9 und AP 2 mit ca. 11-12 % bzw. 7-8 %. In der höheren Konzentration verlaufen die Werte von AP 9 deutlich niedriger als in der GK und die Werte von AP 2 sind etwas größer und bei 8 h am besten. AP 13 hat im Vergleich zu AP 2 in der GK mehr vitale Legionellen, welches sich jedoch in der HK umgekehrt verhält. Jedoch steigen nach 48 h die Werte mit 15 % an.

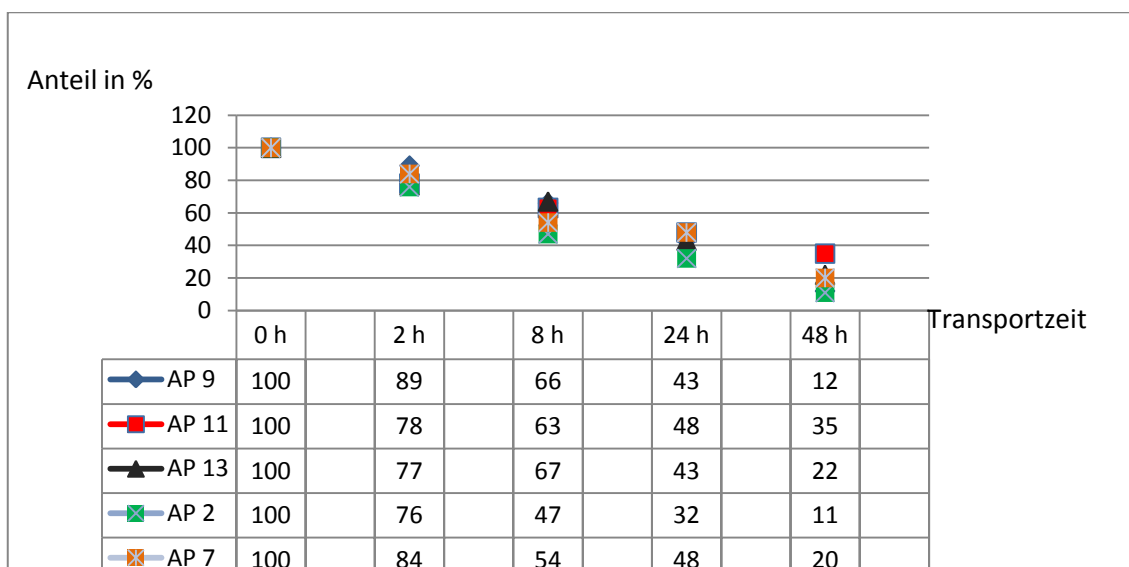


Abbildung 11: Vergleich von AP 2, 7, 9, 11, 13 bei GK

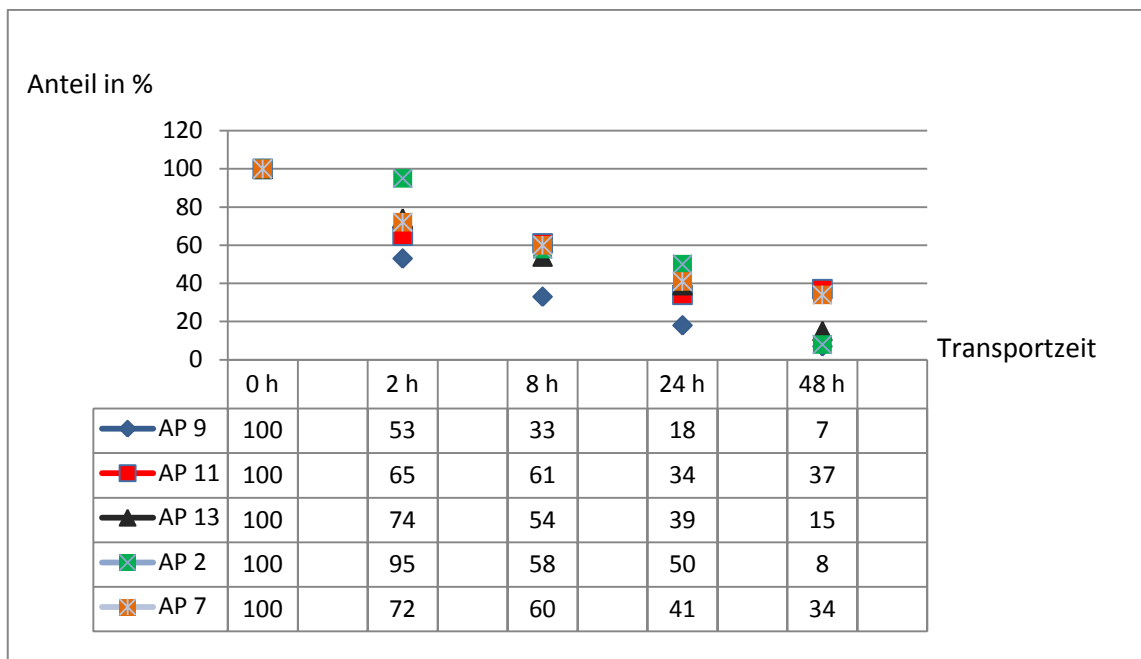


Abbildung 12: Vergleich von AP 2, 7, 9, 11 und 13 bei HK

5.5 Ergebnisse Arbeitspaket 12 im Vergleich zu Arbeitspaket 7

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse von AP 12 im Vergleich zu AP 7 in unterschiedlichen Konzentrationen zu sehen. Zu erkennen ist, dass alle Punkte sich nahe beieinander befinden. Die Werte von AP 12 sind (außer bei 2 h in der GK) etwas besser größer wie bei AP 7. Nach 48 h sind in der GK noch 47 % der eigentlichen Koloniezahl vorhanden, wohingegen bei der höheren Konzentration noch 35 % vorhanden sind. Im Vergleich waren es bei AP 7 20 % bzw. 34 %.

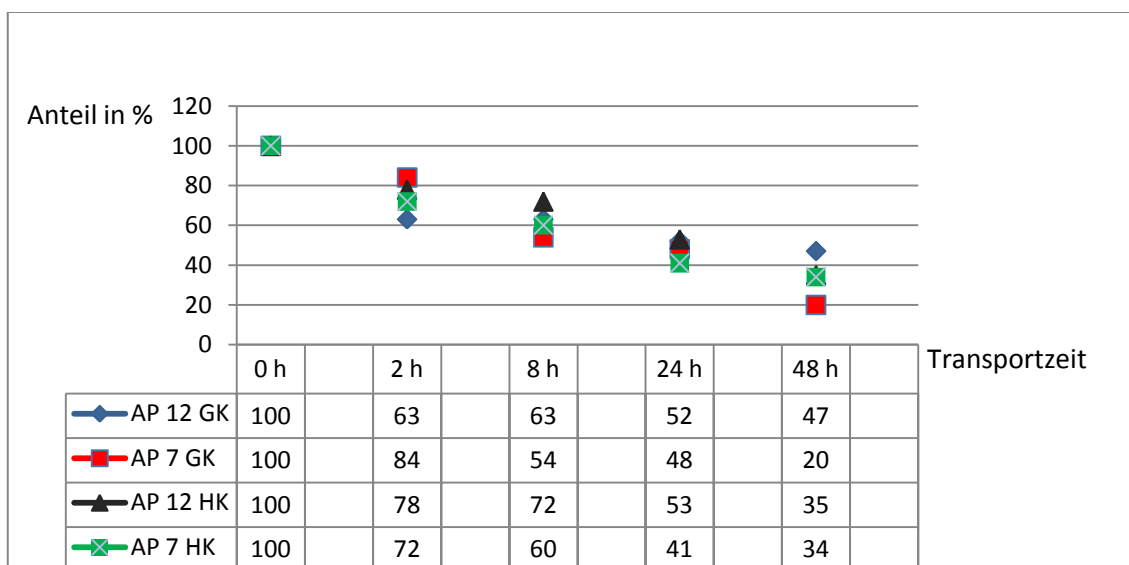


Abbildung 13: Simulation der Kistenöffnungen im Vergleich zu AP 7

5.6 Ergebnisse Arbeitspakete 10, 14 und 15

In Abbildung 14 lassen sich die Unterschiede zu AP 7 erkennen, wenn die Probeflaschen im Voraus gekühlt werden (AP 10). Deutlich zu sehen ist, dass in der GK AP 10 die niedrigeren Werte hat und generell wenig Legionellen überlebt haben (ab 24 h 8 %). Dahingegen verlaufen die Werte dieses Arbeitspaketes in der HK am höchsten und es bleiben selbst nach 24 h noch ca. 50 % der Legionellen erhalten. Die Werte von AP 7 verlaufen intermediär.

In Abbildung 15 deutlich gemacht, sind die Auswirkungen bei einer nochmals erhöhten Konzentration. Die Werte bei 25 °C sind nach 2 h fast 30 % niedriger als bei AP 2 und nach 48 h liegen sie fast 20 % höher (dazwischen befinden sie sich auf ähnlicher Ebene). Bei 45 °C verlaufen die Werte 9-28 % höher (im Vergleich zu AP 7).

Abbildung 16 verdeutlicht die Unterschiede bei einer sehr hohen Ausgangstemperatur. Hier zu sehen ist, dass bei 55 °C in der HK die Werte schon einen fast horizontalen Verlauf annehmen im Gegensatz zu AP 7. Die Werte in der GK steigen dagegen nur bei 8 h und 48 h über die von AP 7.

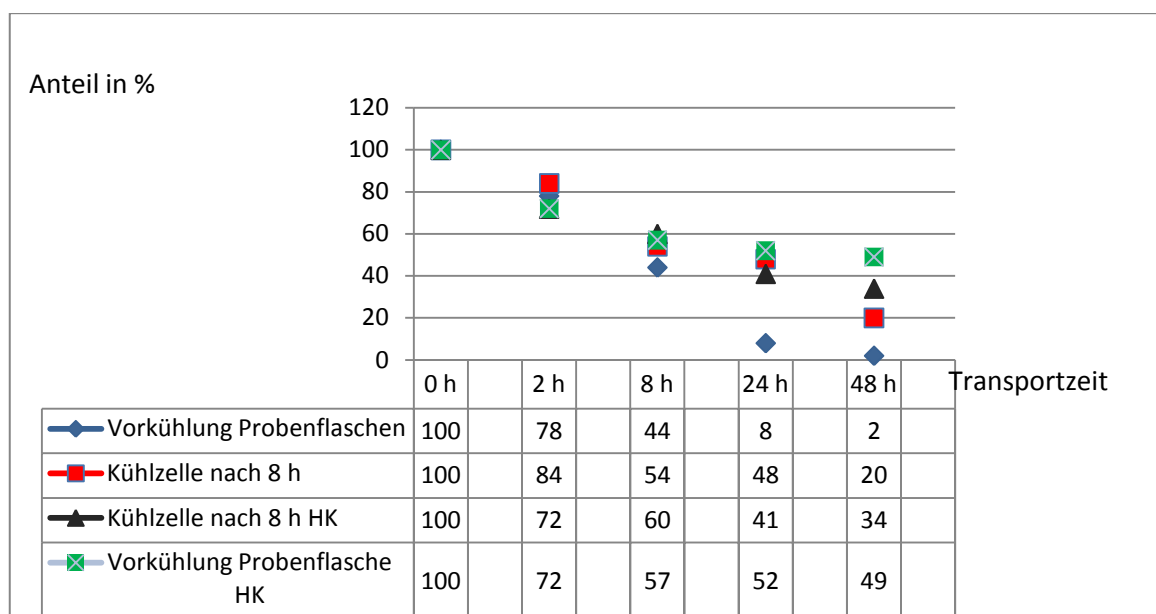


Abbildung 14: Ergebnisse Vorkühlung Probeflaschen

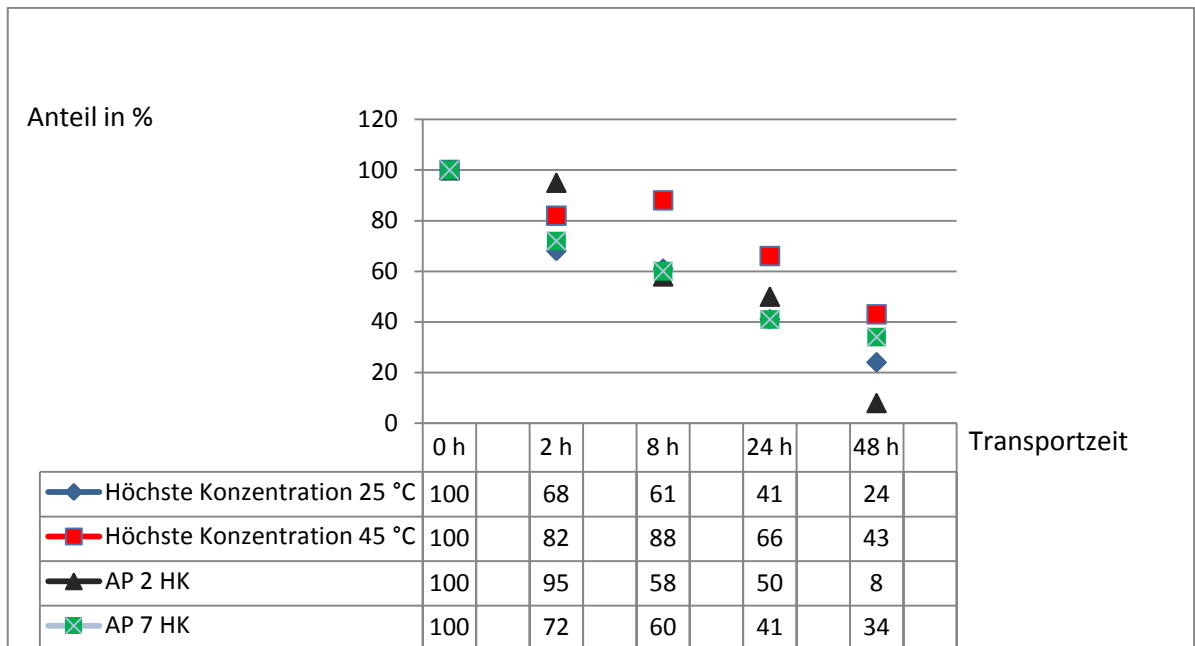


Abbildung 15: Ergebnisse höchste Konzentration

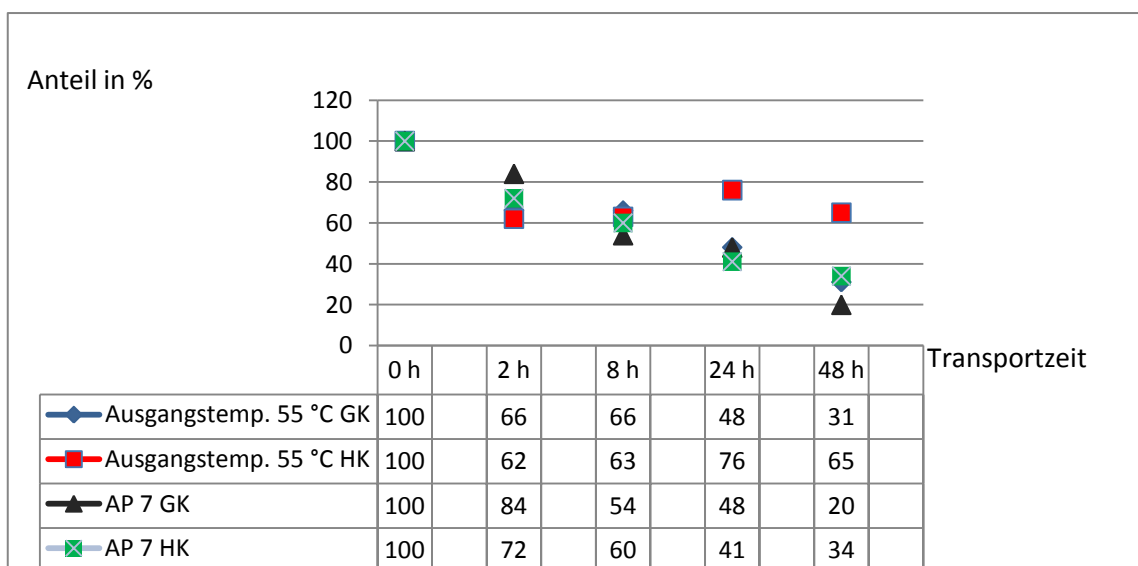


Abbildung 16: Ergebnisse 55 °C Ausgangstemperatur

5.7 Ergebnisse des Säure-/Spülungsansatzes

Tabelle 2: Prozentualer Anteil der Koloniezahlen im Vergleich zur Membranfiltration ohne Spülung oder Säurebehandlung

Spülmittel/Säure	Grenzwertkonzentration	Höhere Konzentration
ohne	100 %	100 %
Säure	74 %	77 %
NaCl 0,9%	90 %	101 %
Aqua dest.	105 %	111 %
Ringerlsg.	95 %	104 %

Die Ergebnisse von Tabelle 2 zeigen die noch vorhandenen Koloniezahlen nach dem Einsatz von Legionellensäurepuffer bzw. verschiedener Spülmittel. Die Membranfiltration ohne Spülung/Säure wurde als Referenzwert mit 100 % assoziiert. Da eine Standardabweichung von 25 % angenommen wird liegen alle Ergebnisse mit ihrer eigenen Standardabweichung im Schwankungsbereich der Ausgangskonzentration. Jedoch sind die Werte der Säurebehandlung mit 74 % und 77 % am niedrigsten.

5.8 Darstellung des Einflusses der Füllmenge der Probenflasche

Wie in Abbildung 17 zu sehen, verlaufen die Punkte der einzelnen Füllvolumina (AP 23) sehr unterschiedlich. Die Werte bei 50 ml nehmen einen stabilen horizontalen Verlauf an und nach 48 h überleben noch 76 % der Legionellen. Die Werte der 200 ml Füllung verlaufen am steilsten nach unten und es befinden sich noch 32 % der Legionellenausgangskonzentration in der Flasche. Die Koloniezahlen des 150 ml Füllvolumens verlaufen dagegen 3-19 % höher. Im Vergleich zu AP 7 sind die Werte ähnlich zu denen der 200 ml Füllvolumina.

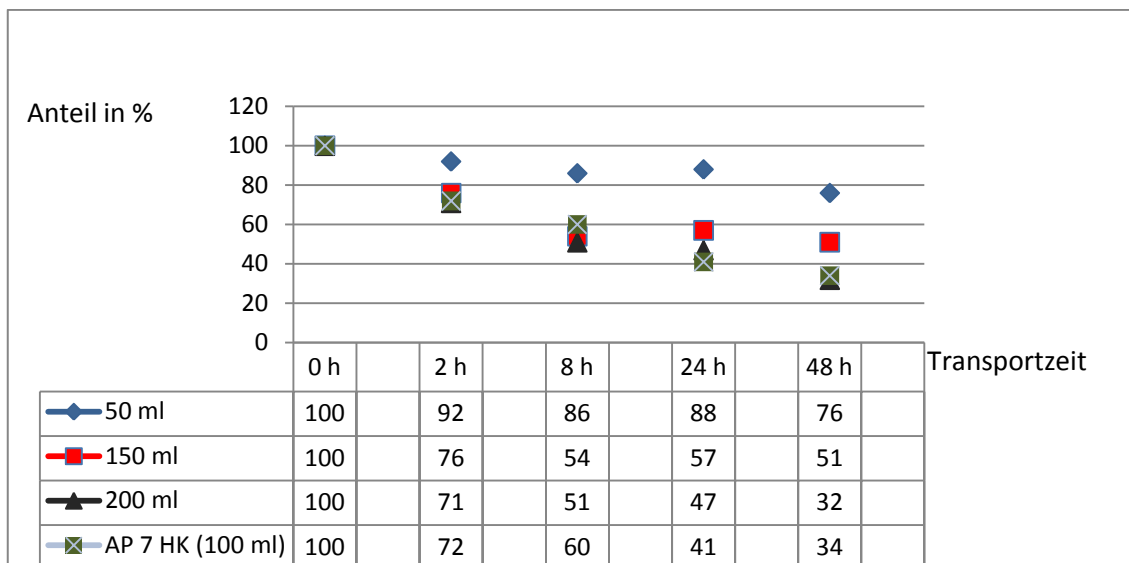


Abbildung 17: Abhängigkeit von der Füllmenge

5.9 Ergebnisse Chlorgehalt

Der Chlorgehalt wurde mit dem Photometer-System überprüft. Bei den eigentlich zu erreichenden Werten von 0,6 mg/l und 1,2mg/l wurde eine Chlorkonzentration von 0,24 mg/l bzw. 0,51 mg/l gemessen (freies Chlor). Auf den Medien sind keine Kolonien gewachsen, außer in Ausnahmefällen bei den 0 h-Werten, bei welchen höchstens eine Kolonie aufwuchs.

5.10 Ergebnisse reales Wasser

Tabelle 3: Mehrfachbestimmung echtes Wasser

Medium	KBE/20 ml
Platte 1	26
Platte 2	29
Platte 3	24
Platte 4	27
Platte 5	27
Platte 6	29
Platte 7	12
Platte 8	10
Platte 9	13
Platte 10	20
Mittelwert	21,7
Standardabweichung	7,42
Prozentuale Abweichung	34,21%

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Probe aus einem realen System zu sehen. Die zehnfache Mehrfachbestimmung des Wassers ergab eine durchschnittliche Koloniezahl von 21,7 KBE. Diese Zahl wird als Ausgangskoloniezahl der Probe angesehen. Die Werte haben eine Standardabweichung von 7,42 und schwanken mit 34,21 % um den Mittelwert. Abbildung 18 bis 23 zeigt Diagramme zu den einzelnen Arbeitspaketen, die mit der realen Probe wiederholt wurden mit 25 % Fehlerbalken. Nach 2 h sinken alle Werte herab. Den höchsten Anteil hat AP 9 mit 78 %, den geringsten Anteil hat AP 4 mit 37 %. Nach 16 h haben alle Pakete den höchsten Punkt erreicht, wobei AP 13 mit 124 % deutlich über 100 % liegt und AP 4 mit 55 % die wenigstens vermehrungsfähigen Legionellen hat. Nach 24 h und bis 48 h sinken die Werte wieder. Bei AP 6 haben nur 25 % der Legionellen überlebt und bei AP 9 mit 58 % die meisten. Die mikroskopische Auswertung der NN-Medien ergab, dass auf den Medien der 1000 ml, 100 ml und 10 ml Filtrationen Amöben aufgewachsen sind, jedoch konnte auf den Medien der 1 ml und 0,1 ml Filtration keine Amöben detektiert werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich 100-1000 Amöben/l in der Probe aus dem realen System befinden.

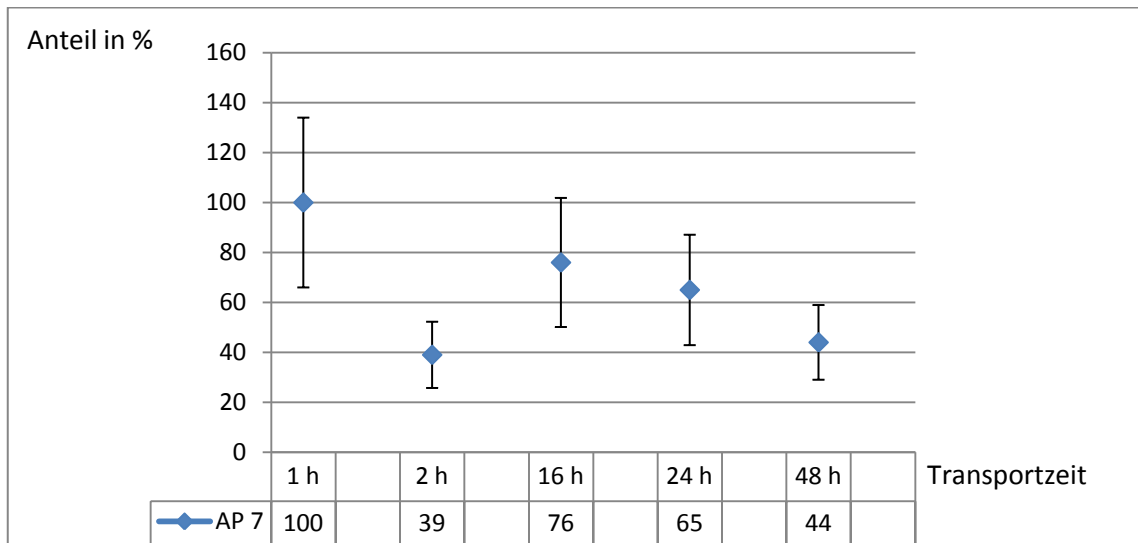


Abbildung 18: AP 7 reale Probe

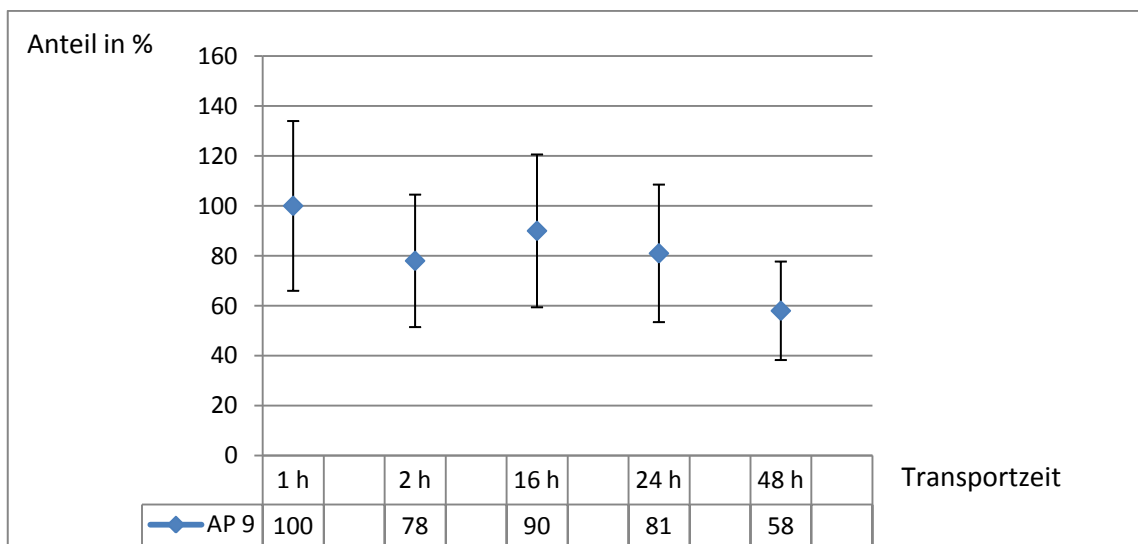


Abbildung 19: AP 9 reale Probe

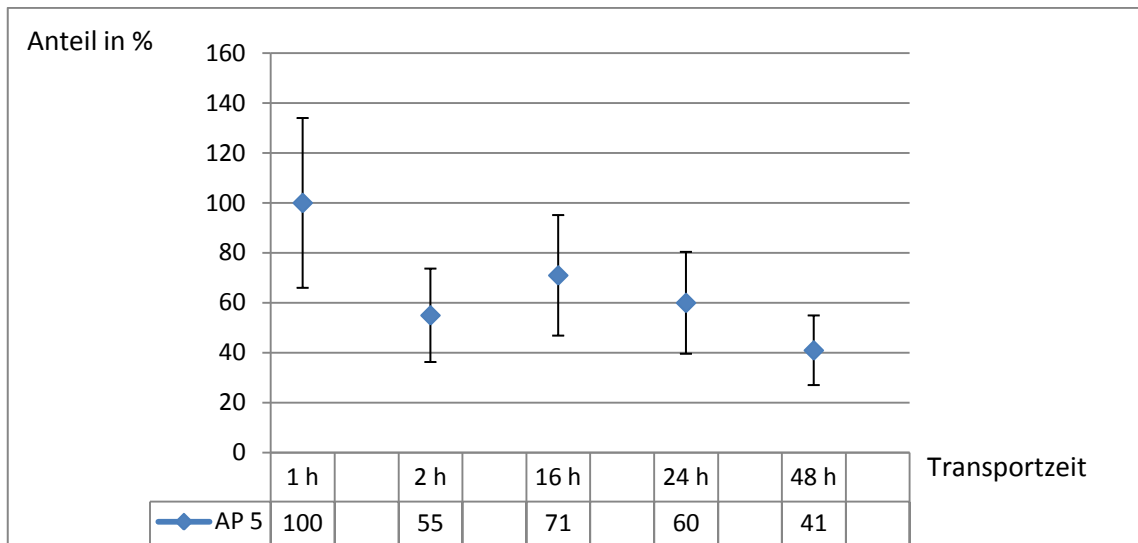


Abbildung 20: AP 5 reale Probe

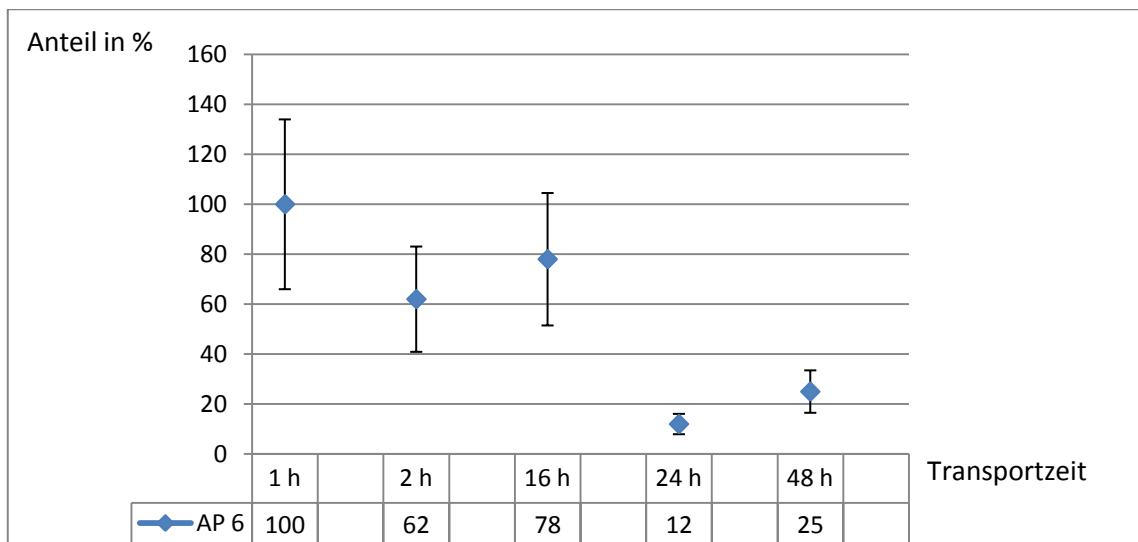


Abbildung 21: AP 6 reale Probe

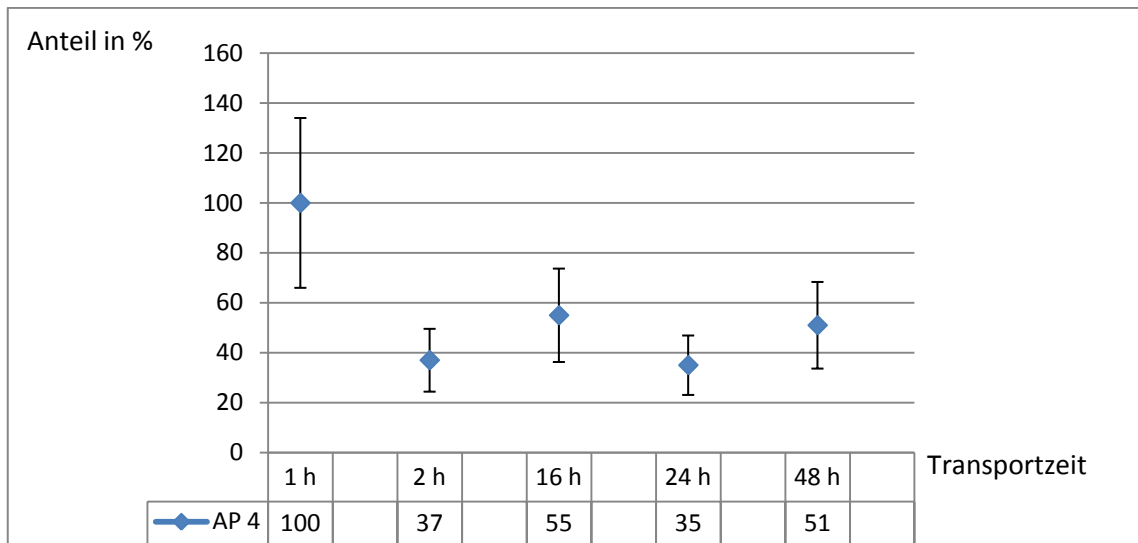


Abbildung 22: AP 4 reale Probe

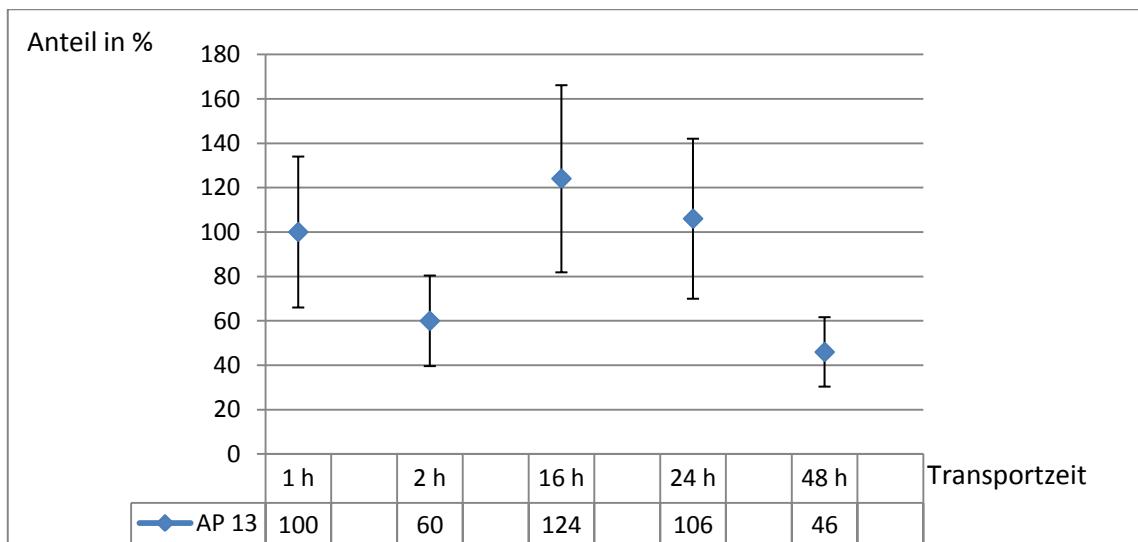


Abbildung 23: AP 13 reale Probe

5.11 Ergebnisse AP 24

Das Diagramm in Abbildung 24 zeigt einen Vergleich der Werte von AP 7 und AP 24. Bei 2 h liegen die Werte der entsprechenden Konzentrationen nahezu identisch, genauso wie bei 24 h. Erst bei 8 h sind die Werte der 100 ml Flaschen in der GK mit 12 % nennenswert größer und die Werte der üblichen Flaschen sind in der HK 7 % besser. Ab 48 h liegen die Werte wieder dicht beieinander, wobei der Wert von AP 7 in der GK mit 20 % am geringsten ist.

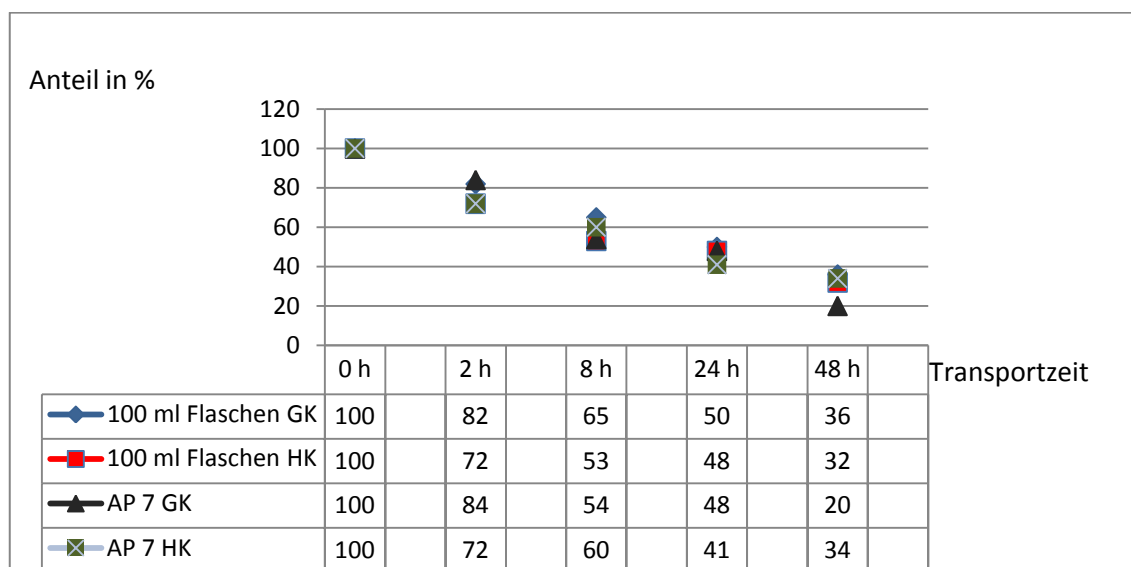


Abbildung 24: Vergleich unterschiedlicher Probeflaschen

5.12 Ergebnisse AP 25

Anhand des Diagramms in Abbildung 25 kann der unterschiedliche Verlauf der Koloniezahlen über die Transportzeit mit unterschiedlichen Kühlmethoden betrachtet werden. Nach 2 h liegen die Werte auf gleicher Ebene, nur AP 7 in der HK liegt unter 80 %. Deutliche Unterschiede erweisen sich erst ab 8 h in der GK, denn hier besitzt die Crush-Eis-Methode 26 % mehr an gewachsenen Kolonien. Bei 24 h sind die Werte dieser Methode auch ca. 10 % größer. Nach 48 h hat durch die Kühlung mit Crush-Eis in der GK 60 % der Ausgangszahl an Legionellen überlebt.

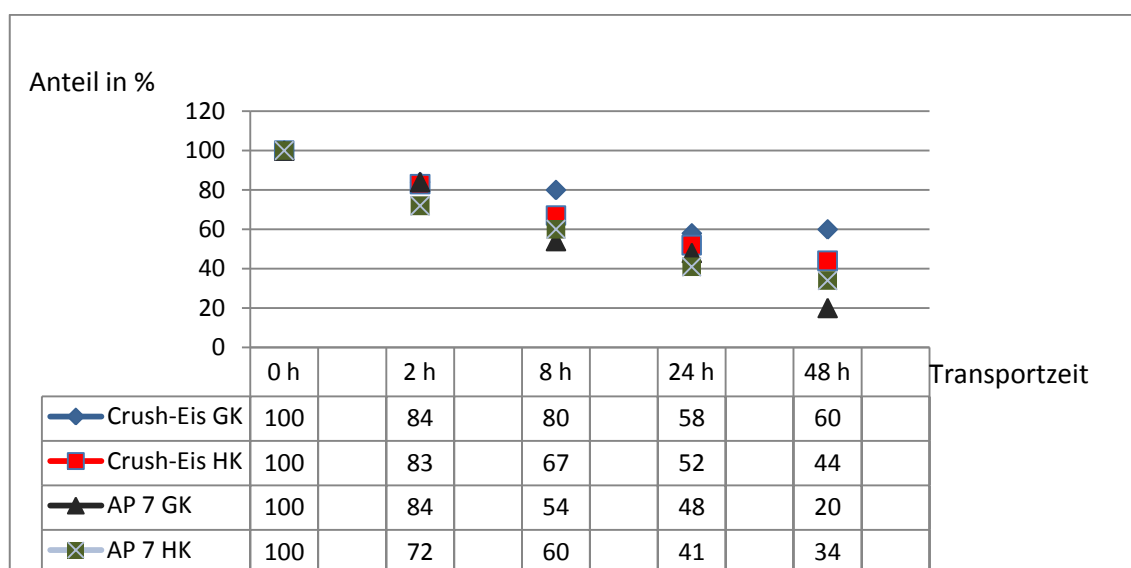


Abbildung 25: Vergleich der Verwendung von Kühlakkus und Crush-Eis

5.13 Hefeextrakt-Suspension

In Abbildung 25 zu sehen, ist der Keimzahlverlauf der Hefeextrakt-Suspension. Die Legionellenzahl sinkt bereits nach 2 h auf ca. 32 % herab. Ab 8 h sind so gut wie keine Legionellen mehr vorhanden. Zum Vergleich dient AP 9, welches unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Hierbei befanden sich nach 2 h noch 89 % und nach 8 h noch 66 % der Legionellen in den Probeflaschen.

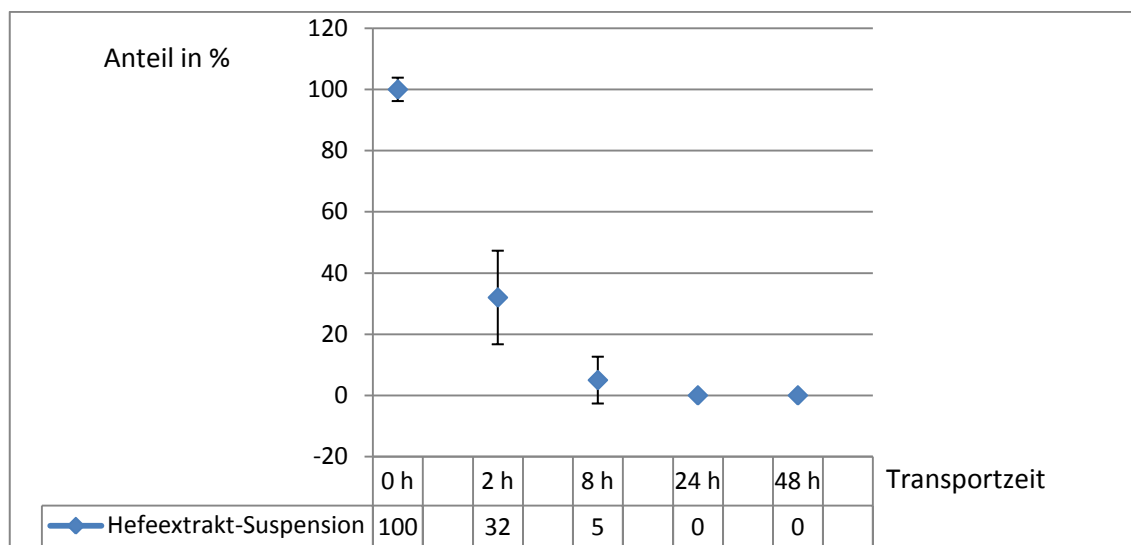


Abbildung 26: Koloniezahlverlauf in Hefeextrakt-Suspension

6 Diskussion

Nachfolgend werden alle Untersuchungsergebnisse diskutiert und erläutert. Auf Grund der großen Standardabweichung dieser Versuche können teilweise nur Vermutungen und Trends aufgestellt werden. Nur Ergebnisse die deutlich nicht in ein und demselben Schwankungsbereich sind können als relevanter Unterschied gewertet werden. Da Leitungswasser für die künstlich hergestellten Probenwässer benutzt wurde, können nicht alle Ergebnisse auf den realen Transport bezogen werden.

6.1 Bewertung der Vorversuche und der Verwendung einer Kryokultur

Die Vorversuche wurden durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Arbeitsergebnisse zu zeigen und die Volumina für die Hauptuntersuchungen festzulegen, damit auswertbare Ergebnisse erhalten werden konnten. Die Reproduzierbarkeit konnte nachgewiesen werden. Bei der zehnfachen Membranfiltration ein und derselben Probe konnten durchschnittlich 9 Kolonien (8,9 aufgerundet) wachsen mit einer Standardabweichung von 2,2. Da sich hier der Quotient aus Varianz und Mittelwert ($\frac{2,2^2}{8,9} = 0,54$) deutlich unter 1,00 befindet, liegen wahrscheinlich systematische Fehler vor, da bei einer Poissonverteilung der Quotient in Nähe von 1,00 liegen müsste. Die Werte schwanken prozentual mit 24,53 %. Dieser relativ große Schwankungsbereich muss beim Auswerten der anderen Untersuchungsergebnisse beachtet werden. Daher wird bei diesen immer eine Prozentualabweichung von 25 % mit einbezogen. Die Gründe für die Ungenauigkeiten liegen zum einen an den nicht exakt erreichbaren Volumina bei der Filtration, sowie der 1000 ml Flaschen und zum anderen an den Kultivierungsbedingungen der Legionellen. Zum größten Teil liegt es aber daran, dass mit lebenden Organismen gearbeitet wird, die immer unterschiedlich vital und vermehrungsfähig sind und auch keine ideal homogene Lösung bilden, wie bei Chemikalien, da diese sich auch in Zellverbänden befinden oder sich verklumpen.

Erwartet wurden 120 bis 200 KBE/10 ml, welche bei weitem nicht erreicht wurden. Die Anzahl der KBE liegt damit in einen statistisch unsicheren Bereich der anfällig für Schwankungen ist. Dadurch nimmt die Präzision deutlich ab. Der Direktansatz ergab 4-5 KBE/ml, erwartet wurden 12-20 KBE/ml. Dieser Wert ist näher am Erwartungswert,

wodurch auch bedacht werden muss, ob die geringen Koloniezahlen der Mehrfachbestimmung auf die Materialien des Membranfilters zurück zu führen sind. Da bei beiden Methoden zu wenige Kolonien erreicht wurden, wurde ein zusätzlicher Vorversuch zur Bestimmung der Keimzahl des Inokulums geführt. Das deutlich zu geringe Koloniewachstum der Membranfiltration kann auch auf den Plattentransport zurückgeführt werden. Die Platten wurden mit Parafilm abgeschlossen und bei sommerlichen Temperaturen transportiert. Die Transportbedingungen könnten das Wachstum der Legionellen behindert haben. Zum anderen ist die Verwendung von NaCl als Verdünnungsmittel nicht empfehlenswert, da hier zu viele Bakterien sterben. Die Filtrationsergebnisse der niedrigeren Konzentration wurden alle auf 100 ml hochgerechnet und ergaben damit einen mittleren Wert von 70 KBE/100 ml. Es wurden 120 bis 200 KBE/100 ml erwartet auf Grundlage des theoretischen Wertes der Kryokultur. Dieser Wert wurde auch nicht erreicht, ist aber noch im akzeptablen Auswertbarkeitsbereich. Anhand dieses Wertes konnten die Ansatzvolumina für folgende Untersuchungen festgelegt werden.

Die Bestimmung der tatsächlichen Keimzahl der Kryokultur erfolgte über einen entsprechenden Vorversuch zur Bestimmung der Keimzahl des Inokulums. Der theoretische Wert der Kryokultur liegt bei 6×10^6 bis 1×10^7 KBE/ml. Davon ausgehend wurden Verdünnungsreihen und Volumina geplant und durchgeführt, um die tatsächliche Keimzahl zu bestimmen. Bei einem erwarteten Koloniewert von 60-100 KBE/100 µl sind durchschnittlich 23 KBE/100 µl gewachsen. Bei einem erwarteten Koloniewert von 120-200 KBE/100 µl sind durchschnittlich 32 KBE/100 µl gewachsen. Beim letzten Wert müsste normalerweise das Doppelte gewachsen sein, die Werte für die letztere Doppelbestimmung schwanken zu sehr mit einem Unterschied von 10 KBE. Deshalb wurde die Keimzahl anhand der 23 KBE/100 µl berechnet. Hochgerechnet auf das Ausgangsvolumen der Kryokultur konnten damit $2,3 \times 10^6$ KBE/1 ml errechnet werden. Die Werte des Direktansatzes des Vorversuches ergaben 4-5 KBE/ml und Ergebnis hochgerechnet auch $2-2,5 \times 10^6$ KBE/ml. Damit kann festgestellt werden, dass durch den Einfrierungsprozess die vermehrungsfähigen Zellen der Kryokultur auf ungefähr ein Drittel herabfallen. Damit ist auch ausgeschlossen die Warmwasserproben für den Transport einzufrieren (auch mit Gefrierschutzmittel), da hierbei zu viele Keime absterben oder vermehrungsunfähig werden.

6.2 Probenwasser aus einem realen System

Die Proben aus dem realen System wurden vorher homogenisiert und eine Mehrfachbestimmung durchgeführt, die 21,7 KBE im Durchschnitt ergab. Die Werte schwanken mit ca. 34 %, welches damit höher ausfiel, als bei der ersten Mehrfachbestimmung, die ca. 25 % ergab. Das lag an den Werten der Platte 7 und 8, die deutlich unter 20 lagen und damit den Mittelwert stark gesenkt haben. Dennoch wurden 21,7 KBE als Referenzwert angenommen. In der Probe des Zirkulationskreislaufes wurden also 21,7 KBE/20 ml detektiert, was 108,5 KBE/100 ml entspricht. Erwartet wurden 200 KBE/100 ml, dadurch sind die Werte der einzelnen Platten sehr gering und anfällig für Ausreißer. Bei den wiederholten Arbeitspaketen konnte zuerst immer ein deutlicher Abfall der Werte bei 2 h und eine deutliche Wachstumssteigerung bis 16 h beobachtet werden. Ab 24 h sanken die Koloniezahlen wieder oder blieben stabil. Warum bis zu 2 h die Koloniezahl so stark abfällt ist unklar, wahrscheinlich werden die Legionellen durch die experimentellen Bedingungen oder das relativ schnelle Herunterkühlen der Proben erst einmal inaktiv. Generell blieben die Ergebnisse aber stabiler als bei den Versuchen mit Leitungswasser. Das vereinfachte Nachweisverfahren von Amöben ergab, dass sich 100-1000 Amöben in der Probe befanden. Die große Schwankungsbreite der Legionellen in der Zirkulation ist üblich, denn es ist nicht bekannt, ob eine lokale Kontamination oder eine Kontamination des Warmwassersystems stattgefunden hat. Die Legionellen sind an Leitungen immobilisiert, daher können mal mehr und mal weniger Legionellen bei der Probenahme heraus gespült werden. Außerdem können Legionellen, die von Amöben gefressen wurden, nicht durch diese mikrobiologischen Verfahren nachgewiesen werden. Wenn bei einer Desinfektion des Systems die Amöben nicht mit abgetötet werden, stellt sich relativ schnell wieder eine Kontamination mit Legionellen ein.

6.3 Bewertung der Arbeitspakete 2,3 und 4, sowie 14, 15 und 23

6.3.1 Einfluss der Transportzeit und der Ausgangskonzentration auf das Untersuchungsergebnis

Mit Arbeitspaket 2 sollte die Einflussnahme der Transportzeit ohne jeglichen anderen Einflussfaktor untersucht werden. Dabei konnte im Grenzwertbereich eine stetige Abnahme der KBE/100 ml detektiert werden. Die Ausgangskonzentrationen lagen bei durchschnittlich 61 KBE bzw. 19 KBE. Bei jedem Wert der einzelnen Zeitpunkte muss mit einer Abweichung von bis zu 25 % gerechnet werden, d.h. da wo sich die Fehlerbalken überlappen kann nicht von einem bedeutungsvollen Unterschied der Konzentration gesprochen werden. Die Koloniezahlen von den 2 h Werten liegen noch in der Standardabweichung, womit hier kein Abfall der Vitalität nachgewiesen werden kann und die Legionellen noch gut mit den vorhandenen Stoffen im Leitungswasser zurechtkommen. Erst ab 8 h kann von einer Dezimierung der Legionellen gesprochen werden. Der Vergleich zu den Werten der Probe zu den realen Systemen zeigt auch, dass sich die Konzentrationen bis über 8 h erhöhen können. Im Vergleich zur DIN Norm konnte allgemein die Aussage bestätigt werden, dass die Proben so schnell wie möglich dem Labor überbracht werden sollten, da eine stetige Änderung der Legionellenkonzentration zu beobachten ist. Nicht unbekannt ist, dass eine längere Verweilzeit in ein und dem gleichen abgegrenzten Wasser die Vermehrung der Legionellen hemmt und die Sterberate zunimmt. Das liegt zum einem an dem begrenzten Nährstoffbedarf der Legionellen und der gegenseitigen Nährstoffkonkurrenz, als auch an den schlechten Abgabemöglichkeit letaler Stoffwechselprodukte. Ein besonderer Abfall der Koloniezahl zeigt sich beim 48-h-Wert. In der Grenzwertkonzentration befinden sich nur noch 11 % der Ausgangskonzentration der Legionellen im Wasser, bei der höheren Konzentration sind es sogar nur 7,89 %. Der Unterschied zwischen den Konzentrationen ist marginal und kann rein zufällig gewesen sein. Vermuten lässt sich, dass eine erhöhte Ausgangskonzentration unter diesen Bedingungen kaum Einfluss hat, da keine Nährstoffe vorhanden sind, wodurch auch keine Konkurrenz oder kaum Vermehrung (Generationszeiten unter diesen Bedingungen können Tage dauern) eintritt. Jedoch könnte in den realen Proben durch bessere Bedingungen ein erhöhtes Wachstum

beobachtet werden, da sich hier mehr Legionellen vermehren (Generationszeit fällt auf wenige Stunden).

6.3.2 Einfluss der Ausgangstemperatur auf das Untersuchungsergebnis

Mit Arbeitspaket 3 sollte die Einflussnahme einer höheren Ausgangstemperatur von ca. 45 °C getestet werden in Betracht auf den eigentlichen Transport ohne Kühlungsbesonderheiten. Dazu kam es bei der hohen Konzentration zu einem Anstieg von 15 KBE nach 2 h und danach zu einer deutlichen Senkung, wie auch bei der Grenzwertkonzentration zu sehen war. Eine deutliche Dezimierung konnte in der GK erst ab 24 h und in der HK erst ab 48 h detektiert werden. Da bei der niedrigeren Konzentration ein stetiger Abfall zu beobachten war, kann vermutet werden, dass es eigentlich bei der höheren Konzentration nicht zu einem deutlichen Vermehrungsschub kommen konnte. Die erhöhten Werte sind auf statistische Zufälligkeiten zurückzuführen, eine Vermehrung unter diesen Bedingungen ist so gut wie ausgeschlossen. Der Ausgangswert von 39,5 KBE ist wahrscheinlich zu niedrig, weswegen die weiteren Werte der HK darüber liegen. Der Trend zeigt einen langsameren Abfall der Lebendzellzahl der Legionellen als bei Arbeitspaket 2, wahrscheinlich wegen den besseren Temperaturbedingungen der Legionellen. Bekannt ist, dass bei 36 °C die Legionellen ihr Wachstumsoptimum besitzen.

Bei einer Temperatur von 55 °C konnten bessere Kurvenverläufe beobachtet werden, als bei 45 °C, vor allem in der HK, hierbei stellte sich ein stabiles System bis 48 h ein und schwankte im Bereich von 60-80 %. Ab 55 °C müsste eigentlich ein verzögertes Absterben der Legionellen beginnen, dies wirkte sich jedoch nur zu Beginn der Untersuchung aus, da die Temperaturen konstant fallen, deswegen ist der 2 h Wert auch bereits so tief mit 62-66%, danach kommt für die Bakterien ein optimaler Wachstumsbereich der Temperatur. Letztendlich zeichnet sich der Trend ab, dass bei einer Temperatur von über 30 °C bis 50 °C ein leicht verzögertes Absterben der Legionellen stattfindet, welches bei erhöhter Konzentration noch stärker ist. Dies kann aber anhand der realen Probe nicht nachgewiesen werden, da Ausgangskonzentration und Ausgangstemperatur fest sind.

6.3.3 Einfluss von Kühlmöglichkeiten

Mit Arbeitspaket 4 sollte gezeigt werden, welchen Unterschied das Bestücken der Transportboxen mit vier Kühlakkus bringen soll. Ab einer Koloniezahl von 33 KBE bzw. 48 KBE wird ein statistisch relevantes Ergebnis erzielt, welches erst ab 24 h eintritt. Dabei sinken die Koloniezahlen weiter auf 11 % und 21 % der Ausgangskonzentration herab. Durch das Herabkühlen mit Kühlakkus konnten Temperaturen von 15,5 °C erreicht werden. Die Kühlakkus wurden nach 8 und 24 h ausgetauscht, jedoch konnte ein Temperaturanstieg nach kurzer Zeit auf Raumtemperatur beobachtet werden. Im Vergleich zu Arbeitspaket 2 zeichnet sich der Trend ab, dass die Koloniezahlen bis 8 h etwa besser erhalten bleiben, fallen aber anschließend bei der Grenzwertkonzentration auf ungefähr das gleiche Niveau. In der Regel soll durch die Kühlakkus eine Herunterkühlung der Proben und damit eine Minderung der Vermehrung und des Absterbens der Legionellen durch Stoffwechselverlangsamung ermöglicht werden. Diese werden auch nur innerhalb von 8 h Stunden genutzt, denn durch die Kühlung werden Temperaturen erreicht, die nicht ausreichend für eine Stagnation der Koloniezahlen sind. Auch ist kein deutlicher Unterschied zur Transportvariante ohne Kühlakkus zu bemerken. Die Anzahl der Kühlakkus spielt keine signifikante Rolle, da die Zeit zum Erreichen einer niedrigen Temperatur bei z.B. acht Kühlakkus kaum Unterschiede bringt. Falls aber mehrere Kühleinheiten genutzt werden, sollte jede Probeflasche gleichmäßig gekühlt werden, d.h. eine gleichmäßige Verteilung der Kühleinheiten in der Box wäre angebracht. Es konnte bestätigt werden, dass innerhalb von einem Tag, die Proben auch bei Raumtemperatur transportiert werden können. Die Ergebnisse der realen Probe zeigten einen deutlichen Abfall der Koloniezahlen auf 35 % bereits nach 2 h, danach schwankten die Werte bis zu 51 % und wurden stabil. Die Lagerung bei Raumtemperatur erreichte Werte wird bis zu 125 %. Es lässt sich vermuten, dass eine Abkühlung der Legionellen direkt nach der Probenahme diese inaktiviert, wodurch im Labor viel weniger Bakterien aufwachsen. Die Nutzung von Kühlmittel scheint sich sogar negativ auf ein repräsentatives Ergebnis auszuwirken und sollte ausgeschlossen werden.

Mit Arbeitspaket 10 sollte überprüft werden, ob das vorherige Kühlen der Probenflaschen vorteilhaft wäre, um bessere Untersuchungsergebnisse zu erhalten. Dies

wurde nur in der höheren Konzentration des Leitungswassers bewiesen, denn hier sind die Werte am höchsten gewesen im Vergleich zu AP 7 und blieben nach 2 h stabil bei ca. 50 %. Jedoch verliefen die Werte für die GK weitaus nachteilhafter. Es wurde angenommen, dass eine vorherige Kühlung der Probenflaschen vorteilhaft wäre, wenn auch marginal, denn eine Kühlzellenlagerung nach 2 h verspricht die repräsentativsten Werte, womit mit einer schnellstmöglich Kühlung auf bis zu 5-8 °C zurückgegriffen werden sollte. Abgesehen von Problemen in der Umsetzung dieser Methode in der Realität kann anhand der Ergebnisse in der GK und der realen Wasserproben darauf geschlossen werden, dass die Vorkühlung eher nachteilhaft für die Legionellen ist.

Mit AP 25 sollte gezeigt werden, wie effektiv eine alternative Kühlmöglichkeit, wie die durch Crush-Eis ist. Durch diese Methoden konnten bessere Werte erzielt werden, die näher am Ursprungswert waren. Durch die effektivere Kühlung blieben die Koloniezahlen näher am Ursprungswert, da die Proben komplett von Kühlmittel umschlossen waren. Eine Umsetzung in der Realität ist als kritisch anzusehen, da das Umgehen mit Crush-Eis aufwendig ist und dieses rapide schmilzt (Verwendung von Tüten empfohlen oder fertige Eispackungen). Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine gleichmäßige Verteilung von Kühlmittel und dessen Menge sich positiv auf das Untersuchungsergebnis auswirkt. Jedoch scheint eine Durchführung mit Wasser aus realem System sich auf das Verhalten der Legionellen ungünstig auszuwirken.

6.3.4 Einfluss einer sehr hohen Ausgangskonzentration

Es sollten Ausgangskonzentrationen über 10^4 KBE/100 ml realisiert werden. Bei 0 h wuchsen zum einen 128 bzw. 112 Kolonien auf den Direktansätzen. Das ergibt also 11200-12800 KBE/100 ml, damit konnte dieser Bereich erreicht werden. Es konnten teilweise höhere Werte erzielt werden als bei den Arbeitspaketen in HK, vor allem der 8 h Wert bei 45 °C Ausgangstemperatur war deutlich höher wie bei AP 7. Jedoch liegen die Werte noch zu sehr im gleichen Schwankungsbereich. Es zeichnet sich aber der Trend ab, dass sich sogar die sehr hohe Konzentration verbunden mit den optimaleren Temperaturbedingungen positiv auf die Überlebensrate der Legionellen auswirkt. Es ist davon auszugehen, dass bei einer sehr hohen Legionellenzahl in einem Warmwassersystem ein deutliches Wachstum bis zu 8 h ab Probenahme stattfinden kann.

6.3.5 Einfluss der Füllmenge der Probenflaschen und der Art der Flasche

Anhand dieser Versuche wurde überprüft, inwiefern die Füllmenge der Probenflaschen Auswirkungen auf das Untersuchungsergebnis haben könnte. Die Ergebnisse bewiesen, dass bei einer Füllmenge von 50 ml die Werte am besten verliefen und nicht ein einziger Werte unter 75 % der Ausgangskonzentration fiel. Die Werte bei 150 ml und 200 ml verliefen dagegen deutlich niedriger. Diese Ergebnisse zeigen, dass je mehr Probenwasser in der Flasche ist, desto weniger repräsentativer das Ergebnis wird. Es konnten aber hierbei nur die HK umgesetzt werden, da sonst die Füllmenge von 50 ml nicht für eine 100 ml Filtration ausreicht. Es könnte sein, dass sich das Verhalten der Legionellen in einer anderen Konzentration verändert. Außerdem sind als Ausgangswert bei 50 ml gerade mal 43 Legionellen gewachsen und bei den anderen Füllmengen 61 Legionellen, wahrscheinlich waren die Lösungen auch nicht ideal homogenisiert. Der Vergleich mit AP 7, in dem eine Füllmenge von 100 ml realisiert wurde, zeigt, dass die Werte fast genauso verlaufen, wie bei 200 ml. Jedoch war hier auch ein deutlich höherer Ausgangswert von 125 Legionellen vorhanden. Es steht auf jeden Fall fest, dass eine Füllmenge von 200 ml sich schlecht auf das Ergebnis auswirkt. Die reale Füllmenge von 150 ml ist empfehlenswert, da hier die Werte besser waren und die Füllmenge von 50 ml schlechter umsetzbar ist, da ansonsten mehrere Probenflaschen für eine Probe gefüllt werden müssen, um mindestens 100 ml für die Filtration zu verwenden.

Mit AP 24 sollte ein möglicher Unterschied zwischen Probenflaschen unterschiedlichen Materials aufgedeckt werden, jedoch lagen die Werte so dicht beieinander, dass kein nennenswerter Unterschied entstanden ist und beide Probenflaschenarten geeignet sind. Jedoch sind die 200-ml-Probenflaschen empfehlenswert, da diese mehr Füllvolumen besitzen und stabiler sind.

6.4 Bedeutung der Lagerung in Kühlzellen

6.4.1 Lagerung ohne Öffnungssimulation

Anhand der Ergebnisse für Arbeitspakete 6, 7 und 8 konnte erwiesen werden, dass eine Kühlzellenlagerung und die damit verbunden Temperatur von 5-8 °C das Absterben und

Vermehren der Legionellen vermindert. So sind unter anderen nach Kühlzellenlagerung nach 2 h noch 25 % bzw. 27 % der Legionellen vorhanden, nach 8 h 20 % bzw. 33 % und nach 24 h 14 % bzw. 25 %. Im Vergleich zur Arbeitspaket 4 sind nur noch 11 % der Ausgangskeimzahl vorhanden gewesen. Statistische unterschiedliche Ergebnisse wurden bei einer Kühlzellenlagerung nach 2 h erst nach 24 h erreicht, wohingegen bei späterer Lagerung schon ein erheblicher Abfall nach 8 h stattfindet, obwohl bei Arbeitspaket 8 in der höheren Konzentration schon nach 2 h ein Abfall stattgefunden hat. Trotz der Kühlung findet dennoch eine deutliche Verminderung stattfindet. Die Ergebnisse der realen Probe zeigten sogar teilweise erheblich niedrigere Ergebnisse. Bei einer Kühlzellenlagerung nach 2 h fallen die Koloniezahlen sogar bis auf 12 % herab. Die Ergebnisse bei späterer Kühlzellenlagerung lagen bei 24 h mit 65 % deutlich höher, bei Raumtemperatur sogar über 100 %. Eine Kühlung auf 2-8 °C ist nach Probennahme nicht zu empfehlen. Durch das Abkühlen der Proben soll bewirkt werden, dass der Stoffwechsel sinkt und die Legionellen inaktiviert werden. Damit soll die Vermehrung und das Absterben verhindert werden. Die Proben sollen sozusagen konserviert werden, um repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Dazu werden die Erreger im Labor kultiviert und sollen wieder „aufleben“, jedoch scheint keine Regeneration statt zu finden. Eine Kühlung der Proben könnte theoretisch komplett weggelassen werden.

6.4.2 Lagerung nach 8 h mit Simulation der Kistenöffnungen

Tabelle 4: Prozentualer Abgleich der Ergebnisse von AP 7 und AP 12

Transportzeit	AP 7 GK	AP 7 HK	AP 12 GK	AP 12 HK
0 h	100 %	100 %	100 %	100 %
2 h	83,51 %	72,40 %	63,45 %	78,33 %
8 h	54,12 %	60,40 %	63,45 %	72,22 %
24 h	48,45 %	41,20 %	51,72 %	53,33 %
48 h	19,59 %	33,60 %	46,90 %	35 %

Bei diesem Versuch wurde das Bestücken in periodischen Abständen von weiteren warmen Flaschen simuliert, um den Einfluss auf das Untersuchungsergebnis im Vergleich zur Kühlzellenlagerung nach 8 h ohne Kistenöffnung (AP 7) zu zeigen. In Tabelle 3 zu sehen, ist der Vergleich zwischen den Arbeitspaketen in dem gezeigt wird,

wie viel Prozent der Koloniezahl im Vergleich zum Ausgangspunkt noch vorhanden sind. Die rot markierten Werte zeigen eine deutliche Dezimierung, da hier die Standardabweichungen sich nicht überlappen (vergleiche dazu Abbildung 35/36 und 45/46 im Anhang). Die Erwartungshaltung war, dass je mehr die Kisten geöffnet und je mehr weitere warme Flaschen hinzu gefügt werden, umso mehr wird das Herabkühlen der Box durch die Kühlakkus verlangsamt und die Zahl der Legionellen würde damit mehr schwanken. Da hier jedoch die Legionellen generell eine große Letalität zeigen ist es schwierig, dies auch auf reale Proben zu übertragen. Die Öffnungen haben dafür gesorgt, dass erst ab 24 h eine deutliche Dezimierung der Legionellen stattgefunden hat und wie in der Tabelle zu sehen bleiben nach 48 h auch deutlich mehr Legionellen lebensfähig in der GK, in der HK ist der Unterschied gerade bei 1-2 %. Durch diesen erheblichen Unterschied kann vermutet werden, dass in realen Systemen bei einer erhöhten Temperatur und erhöhter Ausgangskeimzahl auch deutlich mehr Legionellen überleben. Tests mit realen Proben wären empfehlenswert, um den genauen Einfluss der Bestückung mit weiteren warmen Probenflaschen zu bestimmen, jedoch können auch, wie anhand dieser Ergebnisse zu sehen, geringe Unterschiede entstehen. Durch das Verlangsamen der Kühlung, kann vermutet werden, dass bis zu 8 h eine Vermehrung der Legionellen noch stattfinden kann und die Inaktivierung des Stoffwechsels blockiert wird. Die Kurvenverläufe wären wahrscheinlich ähnlich der Lagerung bei Raumtemperatur oder der Lagerung im Brutschrank des Wassers aus dem realen System bis zu 8 h. Dies hängt jedoch von der Menge der Probenflaschen ab, die in eine Transportbox hineingestellt werden.

6.5 Bedeutung der Lagerungstemperatur und des Lichteinflusses, sowie des Chlorgehaltes

Mit Hilfe von Arbeitspaket 9 und 11 sollten erhöhte Umgebungstemperaturen simuliert werden, wie eventuelle Transporterhitze und sommerliche Temperaturen, die während des Transportes auftreten. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine eventuelle Erwärmung der Proben vorteilhafter sein würde, als deren Kühlung. Mit Arbeitspaket 13 sollte überprüft werden, ob das Abdunkeln der Proben nötig ist. Die Kurvenverläufe zeigen in der GK, dass die simulierte hohe Umgebungstemperatur im Gegensatz zu Arbeitspaket 7 (Box bei Raumtemperatur gelagert) kaum Einfluss auf die Legionellen

hat. Ein Transport bei sommerlichen Temperaturen kann bedenkenlos stattfinden, welches auch die Ergebnisse der realen Probe zeigen. Die Kurvenverläufe wären der bei Lagerung im Brutschrank bei 36 °C ähnlich. Normalerweise würde sich eine Art Gleichgewicht der Legionellen einstellen, jedoch wird bei den Versuchen eine künstlich hergestellte Lösung aus Leitungswasser verwendet und damit fehlen die benötigten Nährstoffe. Die Ergebnisse von AP 9 zeigten hier sogar mit die geringsten Werte an vermehrungsfähigen Legionellen.

Auch die Einwirkung von Licht zeigt kaum Unterschiede für die einzelnen Koloniezahlen im Vergleich zu AP 2 (bei dem eine Transportbox zum Abdunkeln verwendet wurde) und befindet sich größtenteils im gleichen Schwankungsbereich. Die Werte liegen in der GK ab 8 h immer 10-11 % höher als bei den abgedunkelten Proben. Da hier die Ausgangszahl der Legionellen bei beiden im Durchschnitt 61 betrug, könnte die Zimmertemperatur etwas mit dem leicht unterschiedlichen Verlauf zu tun haben. Diese war zurzeit des Ansetzens von AP 13 höher und lag bei ungefähr 29 °C, wobei die Temperatur beim Ansetzen von AP 2 bei 26 °C lag. Außerdem wurde AP 2 und AP 13 unterschiedlich durchgeführt, um andere Ausgangskonzentration zu erhalten, da diese bei AP 2 noch zu gering waren. Dadurch oder durch statistische Ungenauigkeiten (in der HK von AP 2 sind gerademal 19 Kolonien gewachsen, bei AP 13 80 KBE) kann nicht bewiesen werden, dass der Lichteinfluss für das Legionellenwachstum bedeutend ist. Wahrscheinlich würde nur eine direkte Sonnenbestrahlung Einfluss auf die Legionellen haben, doch diese wird schon durch das Material der Probenflaschen geschwächt. Lichtdurchlässige Transportboxen wären also eher wegen der Temperaturerhöhung ungeeignet, als wegen der UV-Bestrahlung.

Die Ergebnisse der Chloransätze zeigten, dass Legionellen bereits ab einer Chlorkonzentration von 0,24 mg/l absterben oder inaktiv werden. Höchstens eine Kolonie konnte noch wachsen. Anhand der Ergebnisse konnte nicht analysiert werden, wie stark der Chlorgehalt Einfluss auf die Legionellen während des Transportes hat, aber zu vermuten wäre, dass bei einer Verminderung des Chlorgehaltes, auch die Untersuchungsergebnisse repräsentativer werden, da weniger Legionellen absterben oder inaktiv werden. Zu klären wäre auch, welchen Einfluss dabei Amöben haben, da diese die Legionellen vor dem Chlor schützen können und ob die Legionellen nach 48 h wieder einen aktiven, regenerierten Zustand annehmen.

6.6 Einfluss der mikrobiologischen Analysefaktoren

Auch im mikrobiologischen Labor müssen ergebnisverändernde Bedingungen beachtet und untersucht werden. Dazu wurden u.a. auch der Einfluss von Legionellensäurepuffer und die Spülung mit verschiedenen Chemikalien getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass nur der Einfluss von der Säurebehandlung relevant sein könnte. Das kurze Spülen mit demineralisiertem Wasser zur Waschung des Filters nach der Säurebehandlung, das Spülen mit 0,9 %-igen NaCl zum Ablösen von Legionellen von der Trichterwand und der Einfluss von Ringerlösung sind nicht ausschlaggebend für ergebnisverändernde Diagnostik und wenn, dann nur gering. Das Behandeln mit Säure hat wahrscheinlich Einfluss auf das Untersuchungsergebnis. Es sterben nicht nur die Begleitflora, sondern auch einige Legionellen ab, wahrscheinlich durch den niedrigen pH-Wert von 2,2 oder einer ungünstigen Mineralienzusammenstellung des Puffers, die hypertonisch oder hypotonisch auf die Legionellenzellen wirken. Unterschiedliche Ausgangskonzentrationen bewirken eher marginale Unterschiede. Diese lagen zusammengefasst etwas höher als bei der Grenzwertkonzentration, welches auf die erhöhte Zahl an Legionellen zurückzuführen ist oder rein zufällig sein kann. Da die Behandlung mit NaCl die Legionellen von der Trichterwand lösen soll, jedoch auch ein Absterben der Legionellen bewirkt wird, gleicht sich dies wieder aus. Die Tendenz lag eher negativ im Vergleich zum Referenzwert. Der Behandlungsschritt mit NaCl sollte daher weggelassen werden. Bekannt ist auch, dass diese Lösung als Verdünnungsmittel ungeeignet ist und Legionellen empfindlich auf diese Chemikalie reagieren [Bast, 1999]. Die Werte für die Ringerlösung liegen etwas höher, diese wurde auch nur zum Testen auf Eignung als Verdünnungsmittel untersucht, welches durch die Werte bestätigt werden konnte, zumindest bei kurzer Einwirkzeit. Da aber auch hier geringe Verluste stattfinden könnten, sollte auf eine spezifische Nährstofflösung zurückgegriffen werden, denn hier treten innerhalb einer Stunde so gut wie keine Zellverluste auf [Bast, 1999].

6.7 Bedeutung der Nutzung von künstlichem Probenwasser

Bei allen Versuchen muss bedacht werden, dass hierbei künstliche Bedingungen zum Einsatz kamen und nicht alle Bedingungen von realem Wasser realisiert werden konnten. So wurde auf Leitungswasser zurückgegriffen, welches auch schädliche Einwirkungen auf die Legionellen hat. Es ist davon auszugehen, dass das rasche Absterben der Zellen durch das Leitungswasser als Medium verursacht werden kann, deswegen wurden Versuche mit Wasser durchgeführt, die aus einem realen System kommen und Teile des Biofilms enthalten.

Das Leitungswasser kann einen osmotischen Stress verursachen, wegen des unterschiedlichen Gehaltes an Mineralien, sowie eine schlechte Nährstoffbasis sein, womit die Legionellen nicht aufwachsen. Diese benötigen den Wachstumsfaktor L-Cystein, sowie Eisen(III)-Verbindungen als entscheidende Nährstoffquellen. Außerdem können in dem Leitungswasser geringe Rückstände von wachstumshemmenden Stoffen zu finden sein, wie Chlorverbindungen, Schwermetalle, Pestizide und Tenside [Bast, 1999].

Jedoch fehlen Begleitorganismen, die das Wachstum der Legionellen entscheidend beeinflussen können, positiv durch Protozoen oder negativ durch konkurrierende Bakterien. Besonders problematisch ist dabei das Wachstum auf den Agarplatten zu sehen, da die Legionellen langsamer wachsen, als die üblichen Bakterien, haben diese den Nachteil, das vorhandene Nährstoffreservoir effektiv zu nutzen. Dadurch blockieren und hemmen die Bakterien die Legionellen. Die vorhandenen Antibiotika im GVPC-Medium (zur Bekämpfung der Begleitflora) können das Wachstum der Legionellen auch hemmen. Diese wachsen auf BCYE-Medium deutlich stärker, da hier diese Antibiotika fehlen. Die Begleitorganismen könnten also noch einmal einen erheblichen Einfluss auf die tatsächlich vorhandene Legionellenanzahl haben, vor allem wenn sie in einem abgeschlossenen Probenahmegefäß transportiert werden.

Zu überlegen wäre, die Versuchsreihen mit einer eigens hergestellten Lösung mit geringem Anteil an spezifischen Nährstoffen, wie L-Cystein durchzuführen. Durch das eingeschränkte Nährstoffangebot würden sich die Legionellen nicht zu sehr vermehren, aber was besonders wichtig ist, dass keine toxischen Stoffe vorhanden sind und die Legionellen wahrscheinlich länger überleben, die Kurven würden nicht so steil nach unten verlaufen.

Die Nutzung der Hefeextraktsuspension sollte zeigen, ob ein stabiles System hergestellt werden kann, worin die Legionellenzahl durch die spezifischen Nährstoffe nahezu konstant bleibt. Dennoch konnte auch hier ein rasches Absterben der Bakterien beobachtet werden, die bereits nach 8 h schon auf 0 KBE gesunken sind. Die Letalität war sogar noch größer als bei AP 9. Wahrscheinlich haben weitere spezifische Stoffe, wie das α -Ketoglutarat als wichtiger Wachstumsfaktor gefehlt. Dieser Stoff ist entscheidend bei der Aufnahme von Kohlenstoff und Stickstoff, wie auch bei der Vermittlung des Eisens. Das Wachstum der Legionellen konnte nicht richtig stattfinden. Durch das Fehlen des ACES-Puffers konnte der pH-Wert Bereich von 6,85-6,95 wahrscheinlich nicht konstant gehalten werden [URL-5].

7 Ausblick

7.1 Empfehlung für zukünftige Probentransporte

Empfehlungen für zukünftige Probentransporte können erst nach weiteren vertiefenden und wiederholenden Untersuchungen getroffen werden. Die Punkte der Norm sollten bis dahin genauestens umgesetzt werden. Bis jetzt zeichnet sich ab, dass eine Kühlung der Proben komplett entfallen könnte und ein Transport bei Raumtemperatur stattfinden sollte. Die Proben sollte auch so schnell wie möglich zum Labor gebracht werden, um repräsentativer zu sein. Dafür ist es wichtig, dass Labore, die das Legionellennachweisverfahren durchführen können zentral zu den Probenahmeorten liegen und die Fahrtwege nicht zu weit sind.

7.2 Weitere Untersuchungsmöglichkeiten

Für eine Absicherung der Untersuchungsergebnisse sollten die Versuchsreihen wiederholt werden. Dazu kann beispielsweise eine siebenfache Mehrfachbestimmungen erfolgen, wobei die Versuche auch aufgespalten werden können und die einzelnen Bestimmungen einfach siebenmal an unterschiedlichen Ansatztagen wiederholt werden sollten. Das erhöht die Variabilität und Aussagekraft der einzelnen Arbeitspakete. Alle Versuche sollte mit einer für Legionellen geeigneten Lösung durchgeführt werden, die einer Zusammensetzung des Wassers aus realem Systemen, wie Warmwasser aus Zirkulationsleitungen entspricht, denn eine Beschaffung von realen Proben ist auf Grund der Menge des benötigten Volumens und Ungenauigkeiten der Legionellen im Wasser, sowie Begleitflora nicht zu empfehlen. Außerdem sind Ausgangstemperatur und Ausgangskonzentration nicht festlegbar. Die schon durchgeführten Ansatzmöglichkeiten, wie unterschiedliche Kühlzellenlagerungszeiten, der Einfluss von UV-Licht und Chlor etc. sollten mit dieser Lösung wiederholt werden. Des Weiteren können auch weitere Einflussmöglichkeiten in Betracht gezogen werden, wie die einzelnen Bestandteile des Wassers und andere Mikroorganismen. Zu klären wäre auch inwiefern Amöben Einfluss auf die letztendlich erhalten KBE der Legionellen haben. Dafür wären Amöbenversuche nötig mit unterschiedlicher Konzentration der Amöben. Wichtig zu wissen wäre auch, ob das Natriumthiosulfat (zum Binden des Chlors)

wirklich nützlich ist in den Probenflaschen oder sogar selbst Einfluss auf die Bakterien hat. Da Calcium und Magnesiumionen entscheidend für das Wachstum von Legionellen sein kann, sollte auch untersucht werden inwiefern die Wasserhärte der Probe sich auf das Verhalten der Legionellen während des Transportes auswirken kann. Da diese auch eine Luftfeuchtigkeit von 80-90 % bevorzugen wäre zu klären, inwiefern das notwendig für weitere Untersuchungen wäre und ob Experimente mit unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit umsetzbar sind.

Mit geeigneter technischer Ausstattung könnte auch überprüft werden, ob die Legionellen durch die Transportbedingungen in den VBNC-Zustand (viable but not culturable) wechseln oder sich so in der Probenahmestelle befinden. Der VBNC-Zustand der Bakterien bedeutet, dass diese durch Stressfaktoren in eine Art inaktiven Zustand gehen und sich auf üblichen Nährböden nicht mehr kultivieren lassen. Stressfaktoren für *Legionella pneumophila* sind u.a. die lange Verweilzeit im Trinkwasser, Hitzebehandlungen von bis zu 70 °C oder Chlorbehandlungen von bis zu 0,5 mg/l. Ob diese wieder aktiv werden können beim Kultivieren durch spezielle Nährmedien oder durch Amöben (Wiederbelebung), könnte relevant für den Einfluss des Untersuchungsergebnisses sein [URL-6].

8 Zusammenfassung

Ziel der Bachelorarbeit war es, die Einflüsse der Proben­transport­bedingungen auf den Nachweis von Legionellen in Warmwasser zu zeigen. Das Ziel wurde nur teilweise erreicht. Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, muss eine Lösung für die Experimente verwendet werden, die nährstoffspezifisch für die Legionellen ist und dem realen System ungefähr entspricht. Dafür ist es notwendig, eine Nährstofflösung zu erstellen, die einer realen Probe ähnelt oder teilweise Wasserproben aus realen Systemen, wie Warmwasserleitungen, zu nutzen. Die Ergebnisse mit einfachem Leitungswasser zeigten eine erhebliche Letalität der Legionellen. Einflüsse von unterschiedlichen Transportbedingungen auf Legionellen konnten nur daran bestimmt werden, wie schnell oder langsam diese absterben. Jedoch zeigten die Ergebnisse der Proben aus realen Systemen ein komplett anderes Verhalten der Legionellen. Eine Kühlung durch Kühlakkus, Kühlzellen und sonstigen Möglichkeiten wirkte sich negativ auf die Untersuchungsergebnisse aus. Eine hohe Schwankungsbreite der Ergebnisse führte zu teilweise schwer differenzierbaren Werten, welches eine Interpretation der Verläufe schwierig machte; jedoch konnte bestätigt werden, dass die Koloniezahlen bis zu 16 Stunden erst einmal steigen und nach 16 Stunden wieder sinken können. Wie das Verhalten der Legionellen zwischen den einzelnen Zeiten und nach 48 h ist, muss noch geklärt werden. Auf jeden Fall sollten die Proben so schnell wie möglich dem Labor durch Transport bei Raumtemperatur übergeben werden.

9 Summary

The aim of this thesis was to show the impacts of transport on *Legionella* testing results. This aim was only partially achieved. To obtain representative results, a nutrient solution must be used for the experiments, which is specific for *Legionella* and corresponds approximately to the real system. Therefore it is necessary to create a nutrient solution, which is similar to a real sample or it is necessary to use partially water samples from real systems, such as those of hot water pipes. The results with simple tap water showed a significant mortality of *Legionella*. Influences on the physiology of *Legionella* under different transport conditions could only be determined by the mortality rate. However, the results of the samples taken from real systems showed a completely different behavior of the *Legionella*. Cooling by cold packs, cold rooms and other things had a negative effect on the test results. A high variation in results led to equally treatable values, which made it difficult to interpret the values, but it could be confirmed that the colony numbers once increase up to 16 hours and decrease after 16 hours. The behavior of *Legionella* between the individual times and after 48 h still needs to be clarified. In any case, the samples should be transported to the laboratory at room temperature as quickly as possible.

Literaturverzeichnis

Bast, Eckhard (1999): *Mikrobiologische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 265-307

Behling, Gabriele (2004): *Legionellenproblematik im Trinkwasser*. FLUGS. 1-8

Nachweis von Legionellen in Wasserproben (2013). Standardarbeitsanweisung. 1-8

Normenausschuss Wasserwesen (2006): *Wasserbeschaffenheit- Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 19458:2006); Deutsche Fassung EN ISO 19458:2006*. DIN EN ISO 19458. 68: 1-32

Normenausschuss Wasserwesen (2008): *Wasserbeschaffenheit-Nachweis und Zählung von Legionellen*. DIN EN ISO 11731-2. 5-6

Normenausschuss Wasserwesen (2012): *Aufbereitung von Schwimm- und Badebeckenwasser*. DIN 19643-1:2012-11. 40-41

Quantitativer Nachweis von Amöben in Trinkwasser (2008). Mikrobiologie QM-Arbeitsanweisung. 1-4

URL-1 (17/07/2013) Schindler, Peter R. G.: *Legionellen und die neue Trinkwasserverordnung*. URL: <http://www.hygieneinspektoren.info/component/attachments/download/68>

URL-2 (02/08/2013) Krysmanski, Bernd W.: *Die Amöbe*. URL: <http://www.william-hogarth.de/Amoebe.html>

URL-3 (02/08/2013) Schiffner, Michaela; Prammer, Wolfgang; Halabi, Milo; Mittermayer, Helmut: *Empfehlungen zum Umgang mit Legionellen*. URL:

<http://www.bosy-online.de/Empfehlungen%20zum%20Umgang%20mit%20Legionellen.htm>

URL-4 (02/08/2013): *TWK-Gefährdungsanalyse*. URL: <http://www.fh-erfurt.de/get/fileadmin/GET/Dokumente/TWK-2013/TWK-Gefaehrdungsanalyse.pdf>

URL-5 (13/08/2013): *Legionella-GVPC-Selektivagar*. URL: http://www.heipha.de/files/product/de/186e-1-0101_Legionella-GVPC.pdf

URL-6 (21/08/2013) Flemming, Hans-Curt; Wingender, Jost: *Wann sind Mikroorganismen wirklich tot?* URL: http://www.dvgw.de/fileadmin/dvgw/wasser/aufbereitung/forum2009_flemming.pdf

Anhang

Tabelle 5: Vorversuche

AP	Flaschen- volumen	KBE/100 ml	Ausplattierungs- volumen	Filtrations- volumen
I	1000 ml	100	-	100 ml
		100		50 ml
		100		20 ml
		100		10 ml
II	500 ml	100-1000		10 ml
10fach-Bestimmung		10-100	1 ml	-
bei Filtration				
III	-	60-100/120-200	0,1 ml	-
Kontrolle Inokulum				

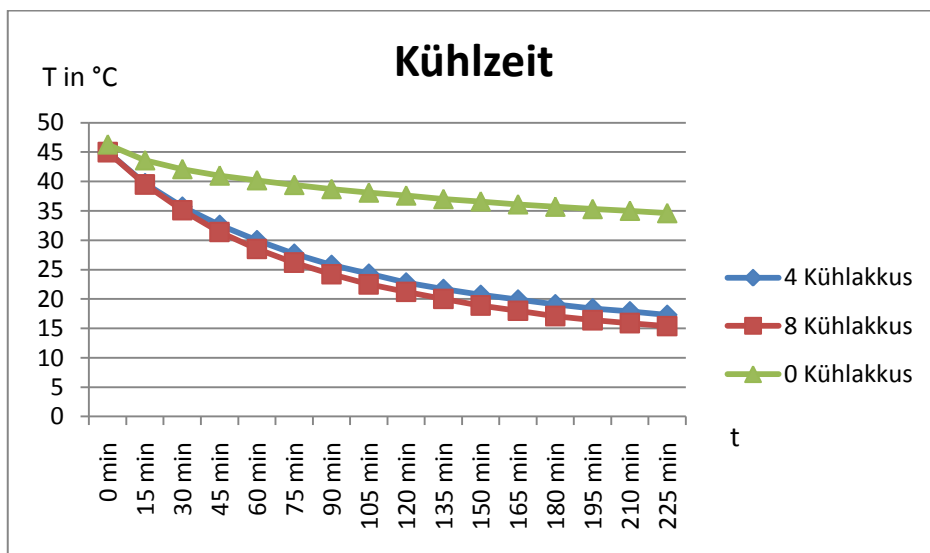


Abbildung 27: Abkühlungsdauer Kühlakkus

Tabelle 6: Hauptuntersuchung Teil 1

AP	T0	Kühl- akkus	Kühl- zelle	T	t Ansatz	Säure/Spül- mittel	Flaschen- volumen	KBE/100 ml	Ansatz- volumen
1	-	-	-	-	-	keine	200 ml	90-195	100 ml
	-	-	-	-	-	Säure	200 ml	90-195	100 ml
	-	-	-	-	-	NaCl 0,9 %	200 ml	90-195	100 ml
	-	-	-	-	-	aqua dest.	200 ml	90-195	100 ml
	-	-	-	-	-	Ringerlsg.	200 ml	90-195	100 ml
	-	-	-	-	-	keine	20 ml	900-1950	10 ml
	-	-	-	-	-	Säure	20 ml	900-1950	10 ml
	-	-	-	-	-	NaCl 0,9 %	20 ml	900-1950	10 ml
	-	-	-	-	-	aqua dest.	20 ml	900-1950	10 ml
	-	-	-	-	-	Ringerlsg.	20 ml	900-1950	10 ml
2	25 °C	0	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	60-200	20 ml
	25 °C	0	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	300-1000	1 ml
3	45 °C	0	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	60-200	20 ml
	45 °C	0	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	300-1000	1 ml
4	45 °C	4	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	60-200	20 ml
	45 °C	4	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	300-1000	1 ml
5	45 °C	0	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml		100 ml
	45 °C	0	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml		10 ml
6	45 °C	4	nach 2 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	90-195	100 ml
	45 °C	4	nach 2 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	900-1950	10 ml
7	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	90-195	100 ml
	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	900-1950	10 ml
8	45 °C	4	nach 24 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	90-195	100 ml
	45 °C	4	nach 24 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	900-1950	10 ml
9	45 °C	0	-	36 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	90-195	100 ml
	45 °C	0	-	36 °C	0;2;8;24;48 h	-	1000 ml	900-1950	10 ml

Tabelle 7: Hauptuntersuchung Teil 2

AP	Besonderheit Probenflasche	T0	Kühl- akkus	Kühl- zelle	T	t Ansatz	Flaschen- volumen	KBE/100 ml	Ansatz- volumen
10	2-8 °C	45 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
	2-8 °C	45 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
11	Brutschrank	45 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
	Brutschrank	45 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
12	zwischen 0 h-8 h aller 60 min eine Flasche in Box	45 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
13	ohne Box (Lichtaussetzung)	25 °C	0	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
	ohne Box (Lichtaussetzung)	25 °C	0	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
14	-	25 °C	0	-	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	9000- 19500	1 ml
	-	45 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	9000- 19500	1 ml
15	-	55 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
	-	55 °C	4	nach 8 h	25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
23	50 ml Inhalt	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
	150 ml Inhalt	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
	200 ml Inhalt	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
24	Glasflasche	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
25	Crush-Eis	45 °C	0	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	0	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
28	Hefeextrakt- Suspension	45 °C	0	-	36 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml

Tabelle 8: Sonstige Untersuchungen

AP	Besonderheit	T0	Kühl- akkus	Kühl- zelle	T	t Ansatz	Flaschen- volumen	KBE/100 ml	Ansatz- volumen
16 (7)	Chlorgehalt 0,05 mg/l	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
17	Chlorgehalt 0,6 mg/l	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
18	Chlorgehalt 1,4 mg/l	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
19	kaum Wasserhärte	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
20	große Wasserhärte	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
22	Amöben	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
22	Amöben andere Konzentration	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
26	Glasbehälter	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
27	andere Transportbox	45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	90-195	100 ml
		45 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml	900-1950	10 ml
29	reale Probe	50 °C	4	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml		20 ml
		50 °C	0		36 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml		20 ml
		50 °C	0	nach 8 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml		20 ml
		50 °C	4	nach 2 h	2-8 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml		20 ml
		50 °C	4		25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml		20 ml
		50 °C	0		25 °C	0;2;8;24;48 h	1000 ml		20 ml

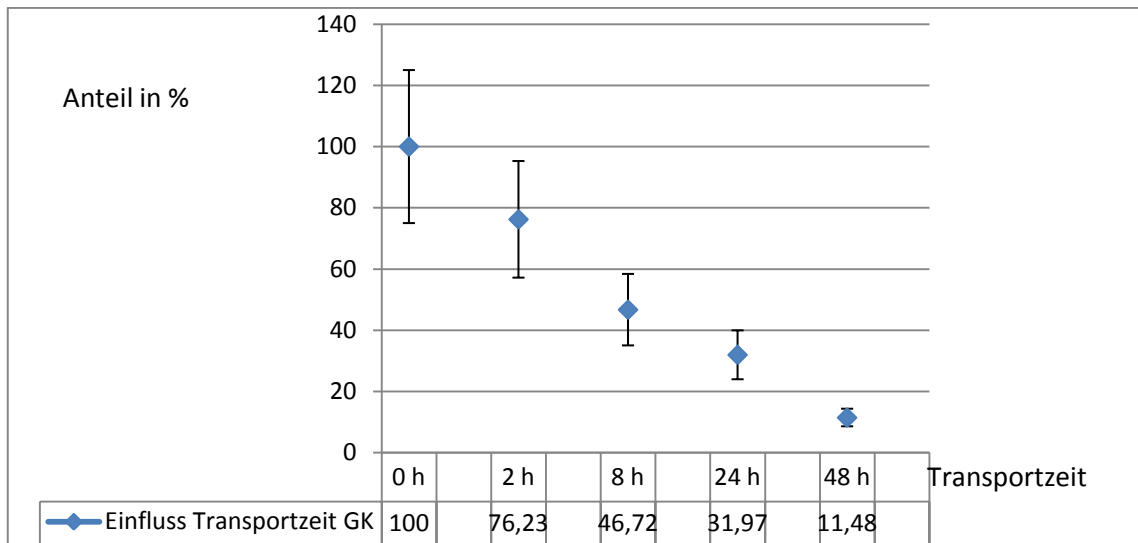


Abbildung 28: AP 2 GK

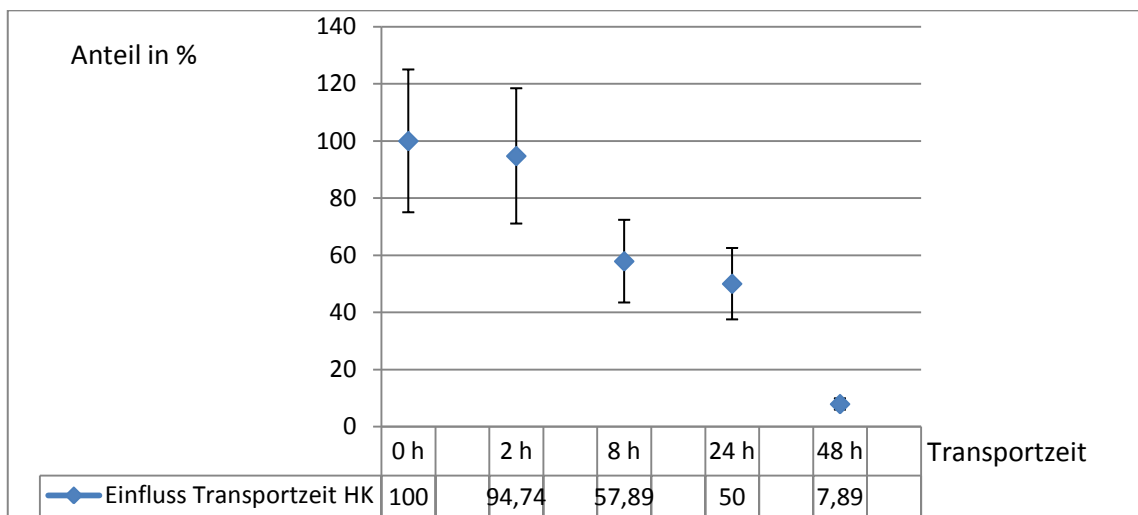


Abbildung 29: AP 2 HK

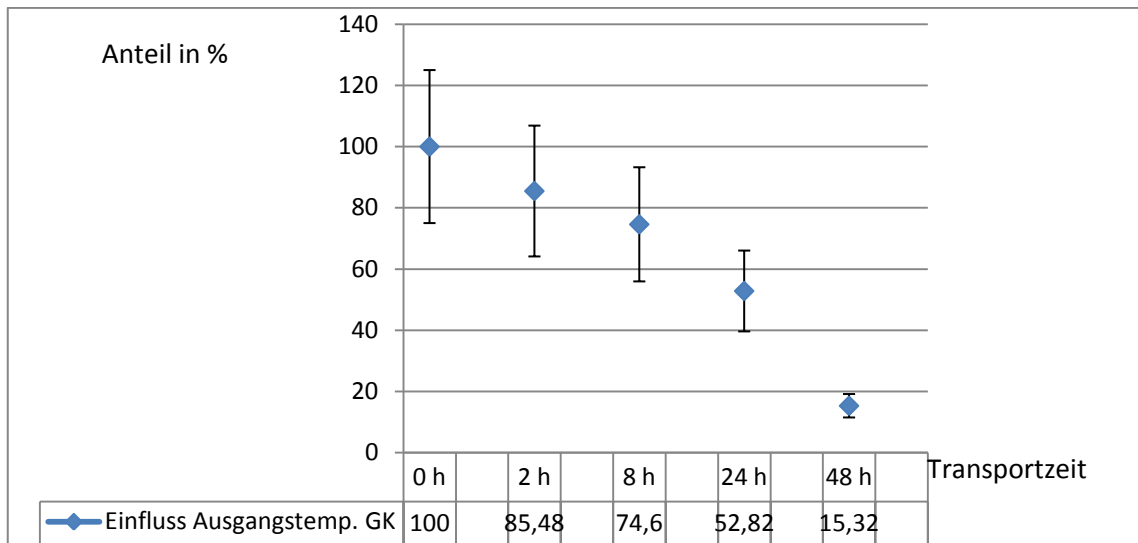


Abbildung 30: AP 3 GK

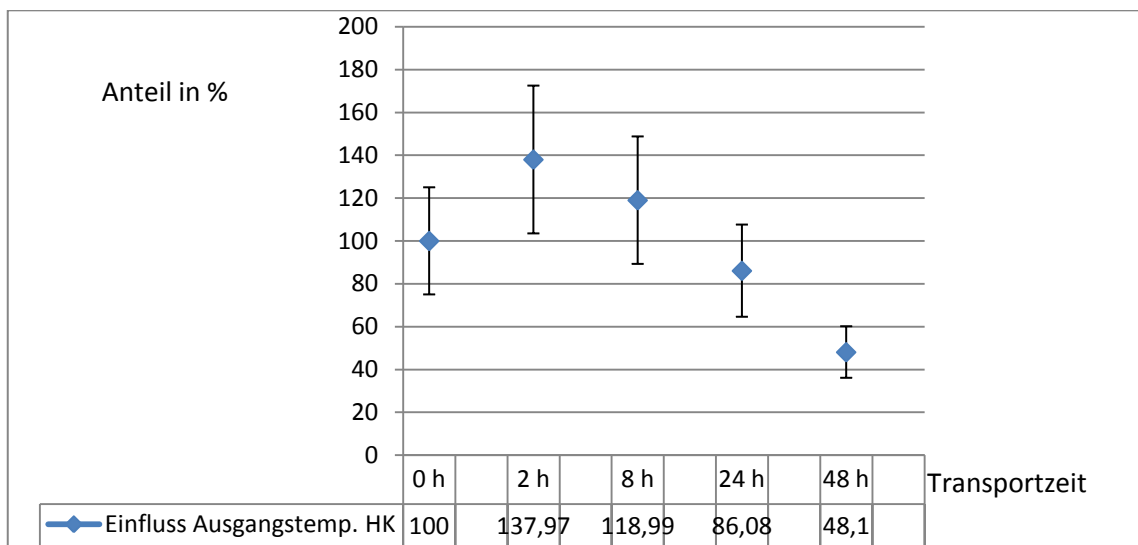


Abbildung 31: AP 3 HK

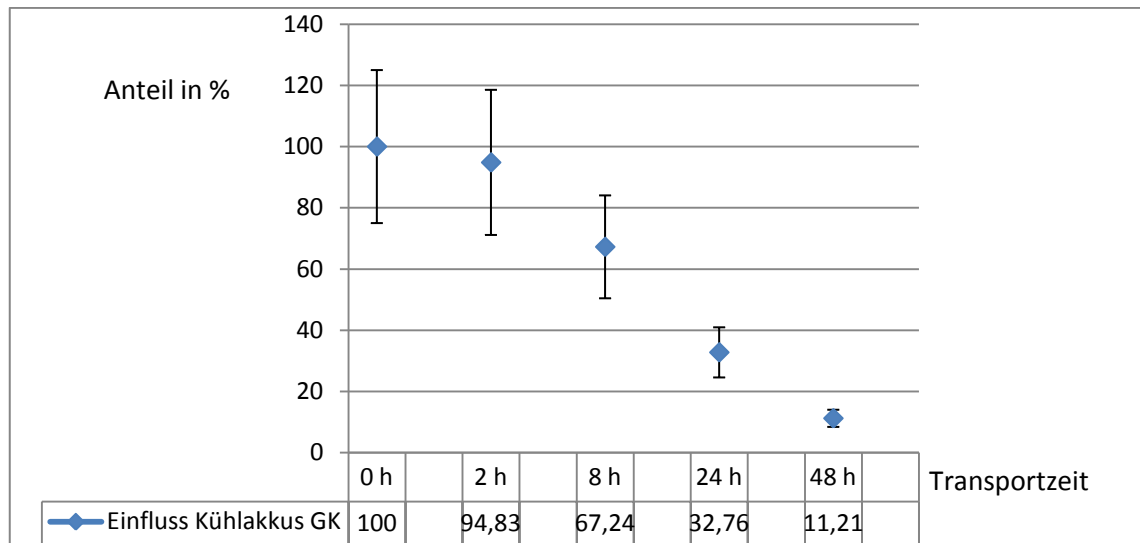


Abbildung 32: AP 4 GK

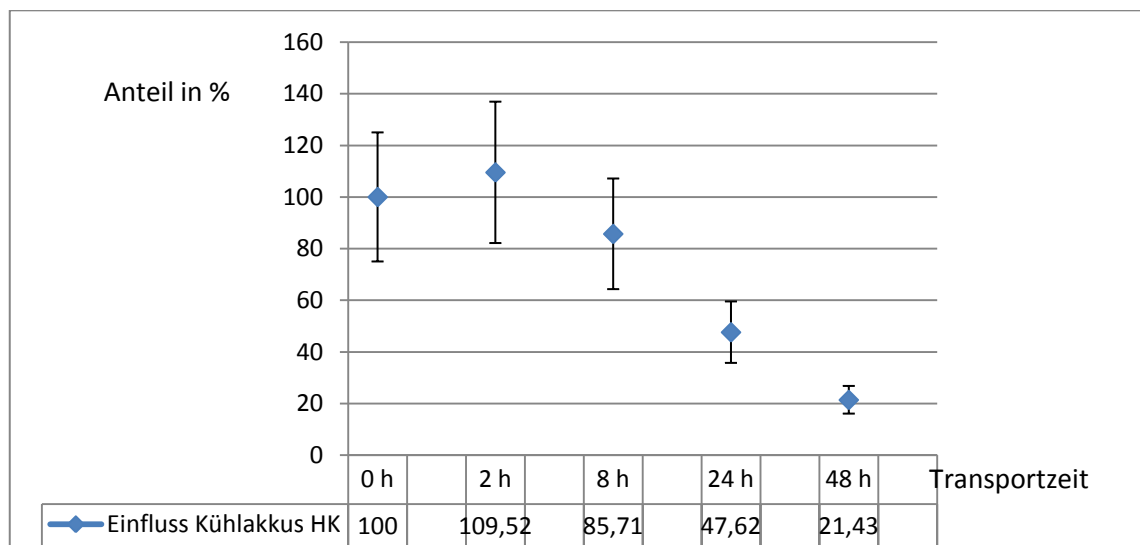


Abbildung 33: AP 4 HK

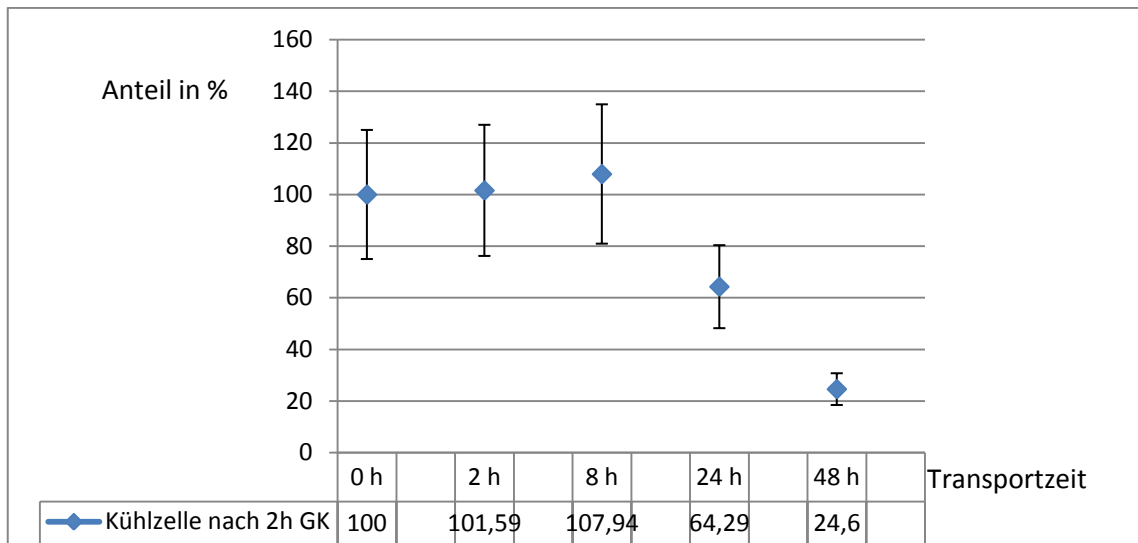


Abbildung 34: AP 6 GK

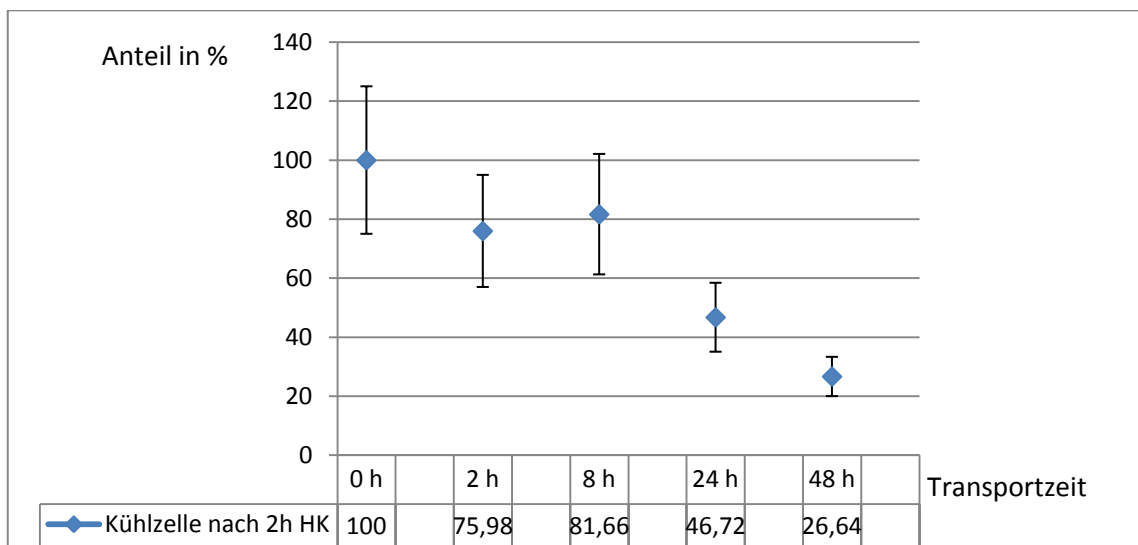


Abbildung 35: AP 6 HK

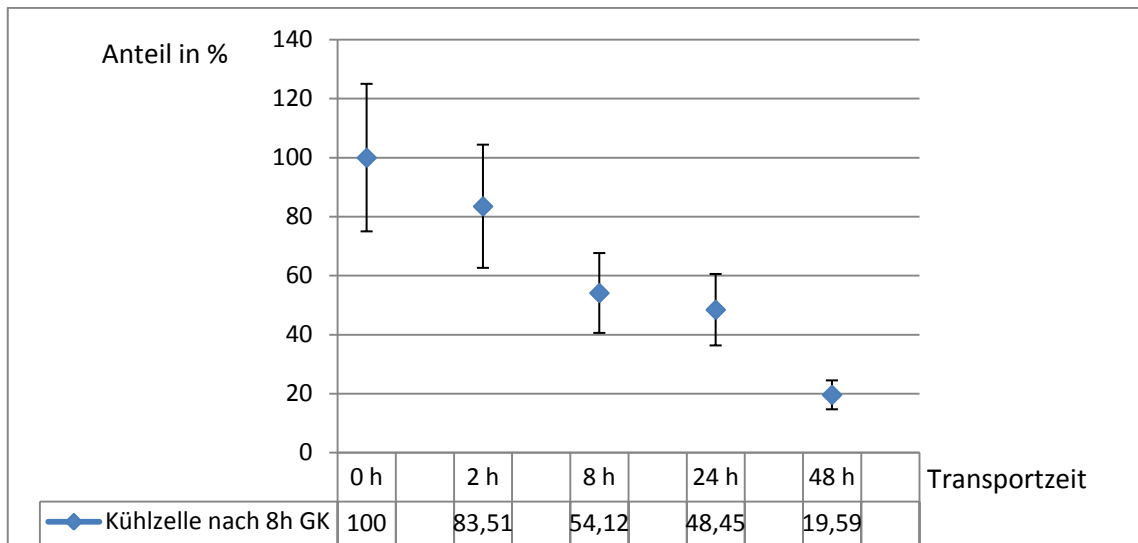


Abbildung 36: AP 7 GK

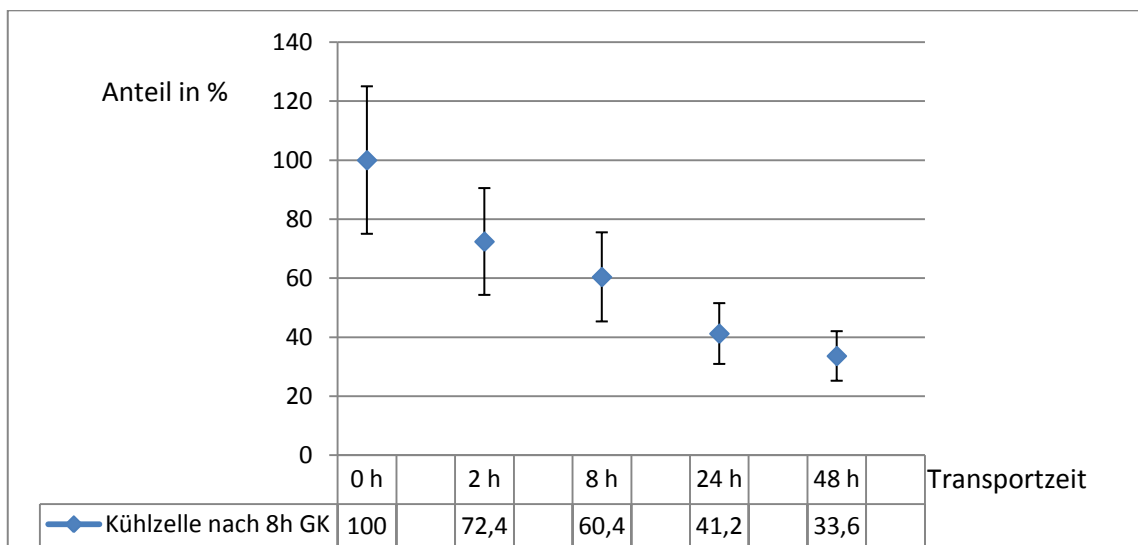


Abbildung 37: AP 7 HK

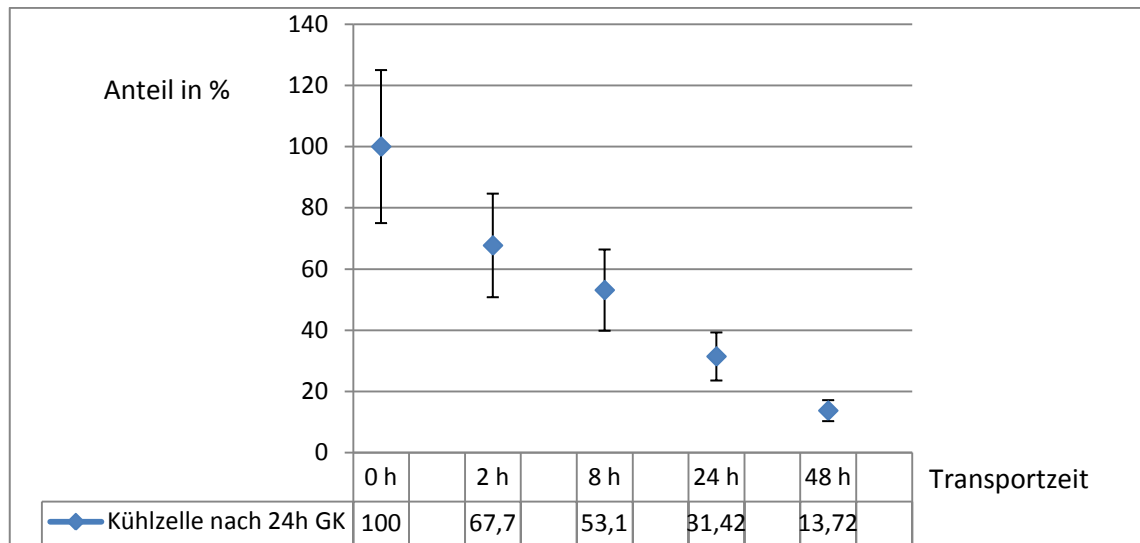


Abbildung 38: AP 8 GK

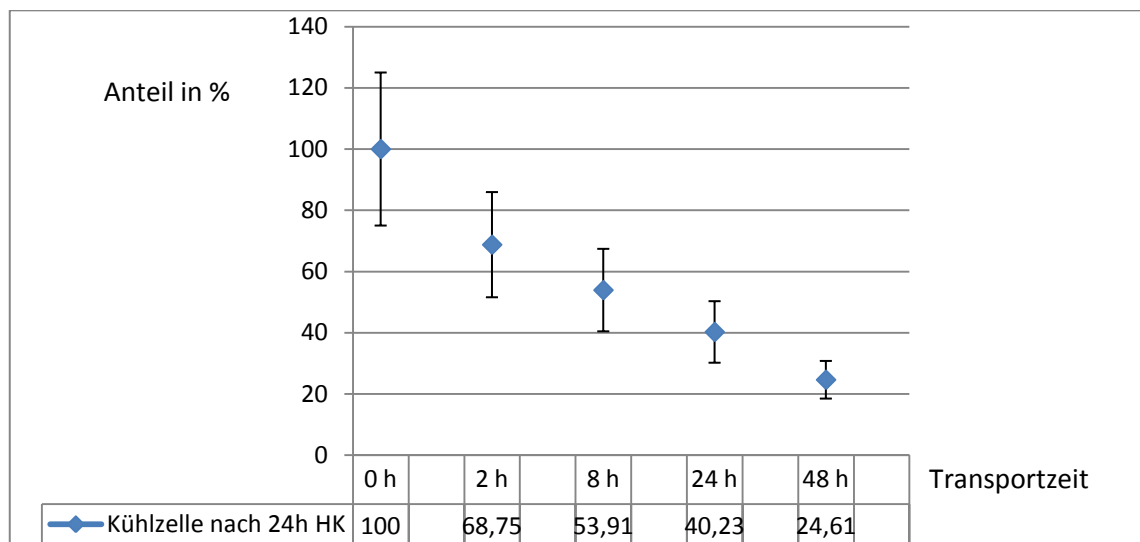


Abbildung 39: AP 8 HK

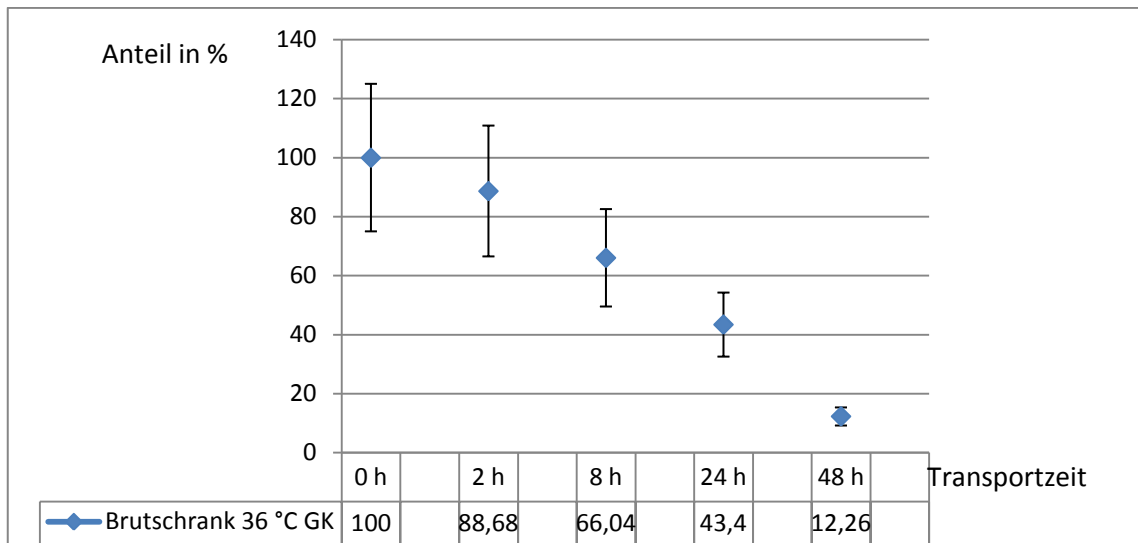


Abbildung 40: AP 9 GK

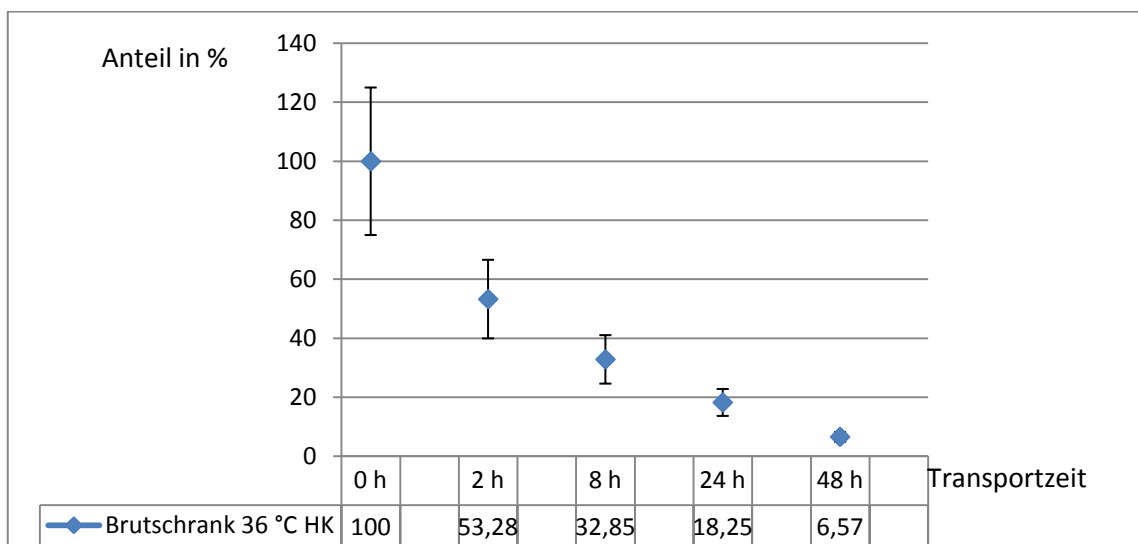


Abbildung 41: AP 9 HK

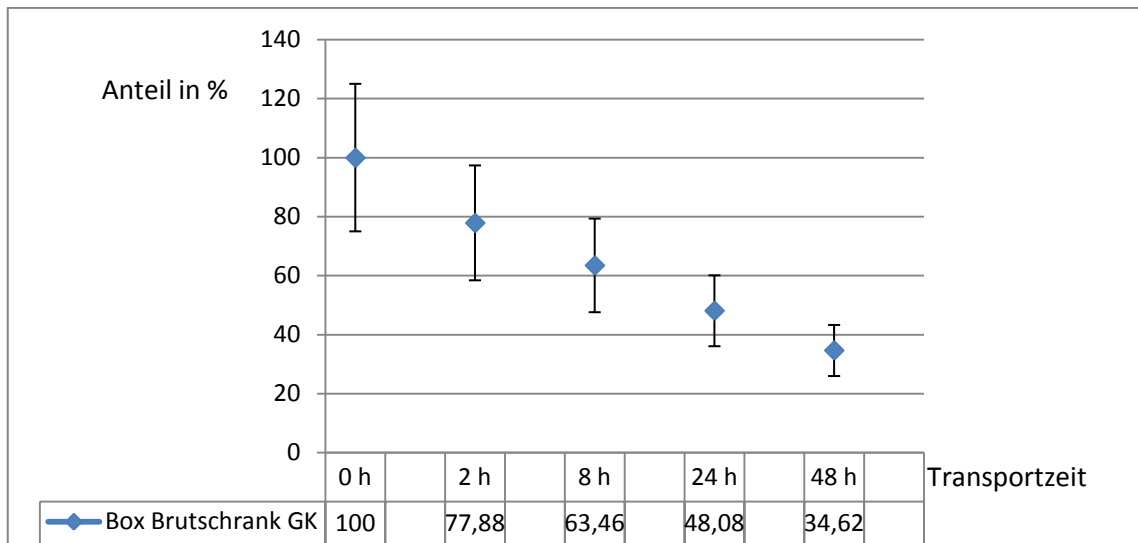


Abbildung 42: AP 11 GK

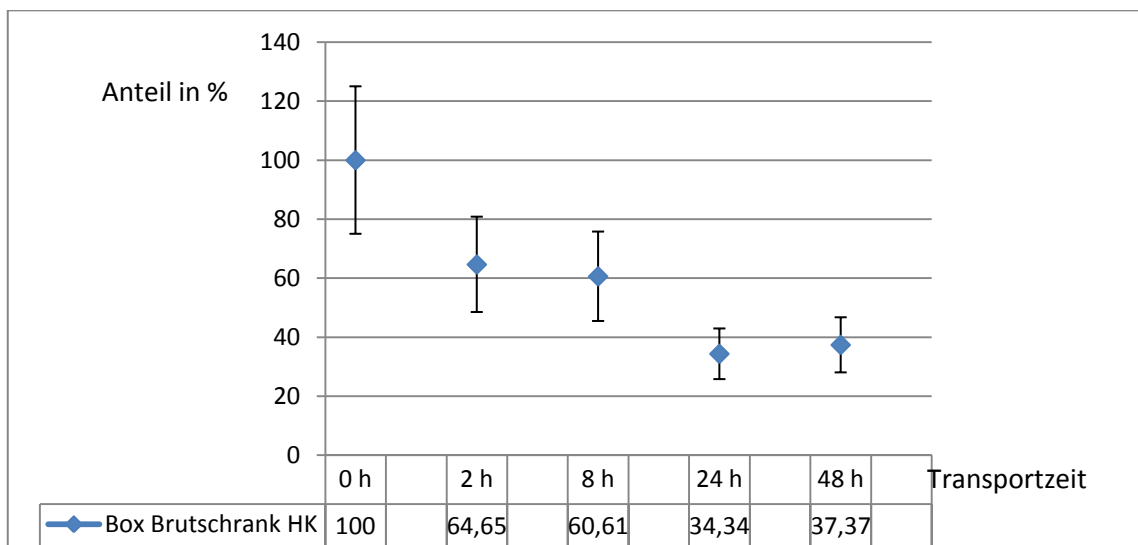


Abbildung 43: AP 11 HK

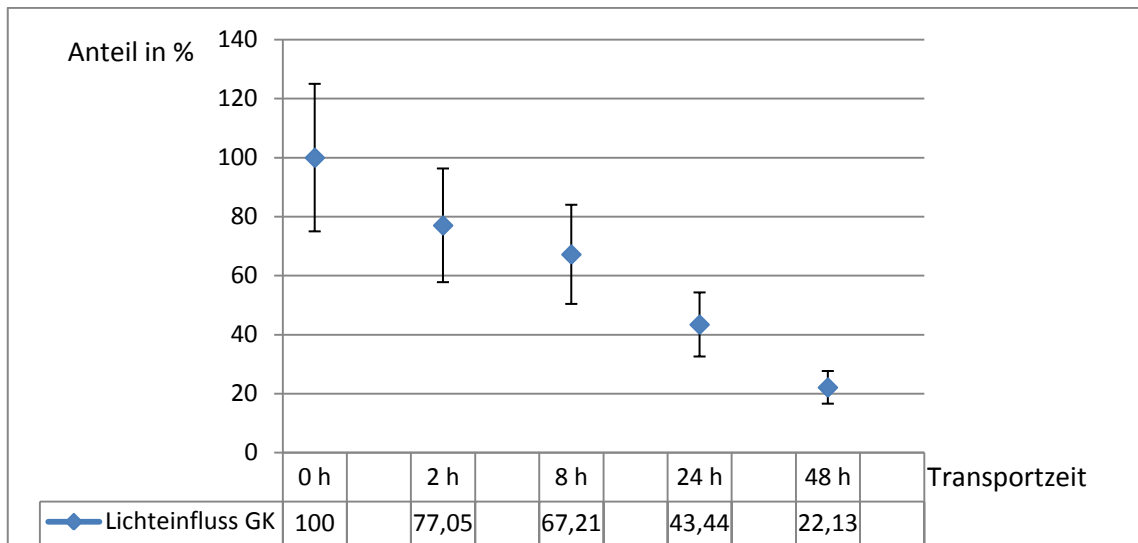


Abbildung 44: AP 13 GK

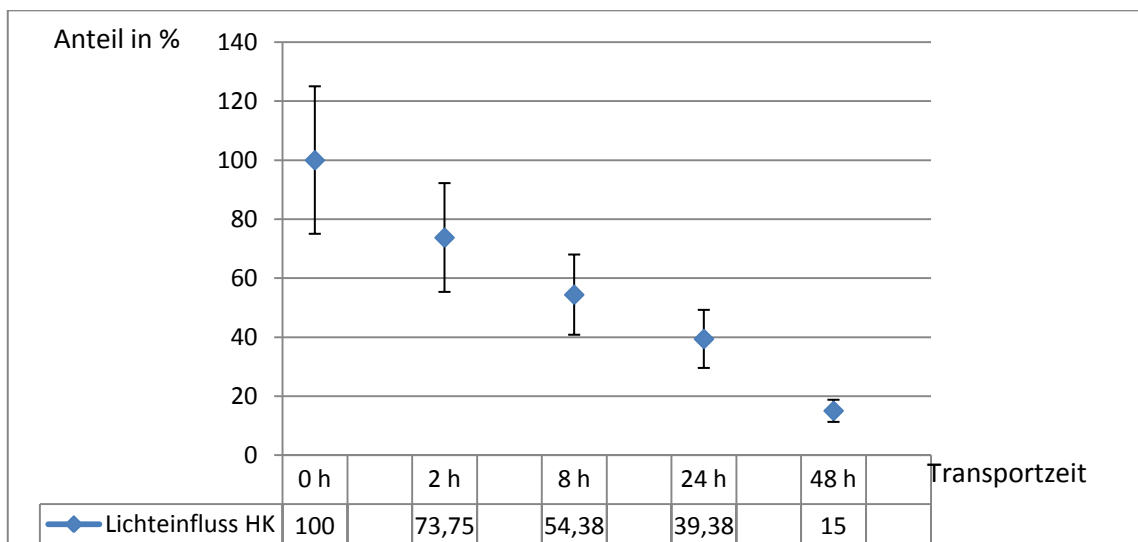


Abbildung 45: AP 13 HK

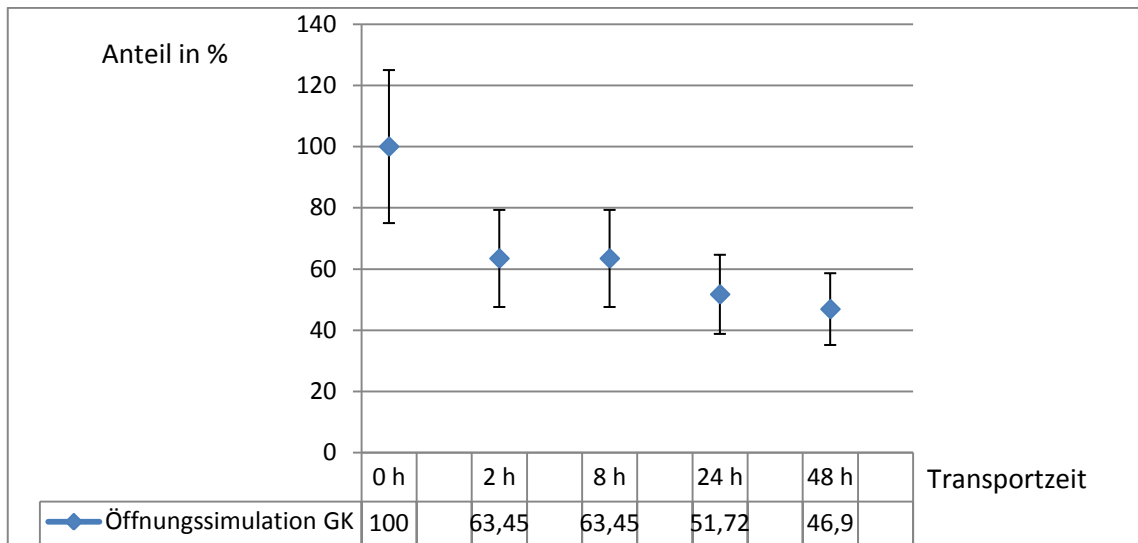


Abbildung 46: AP 12 GK

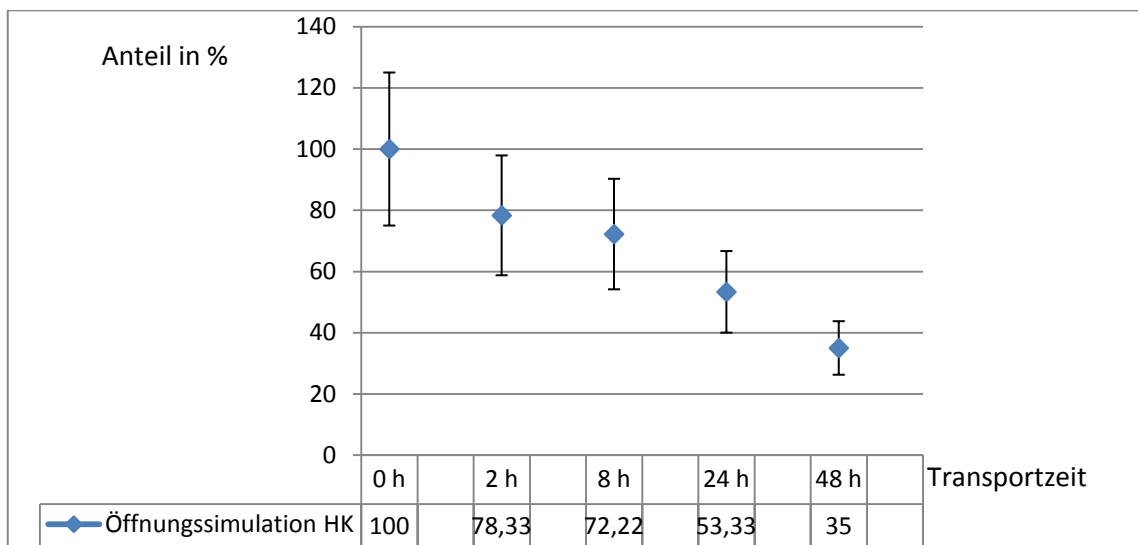


Abbildung 47: AP 12 HK

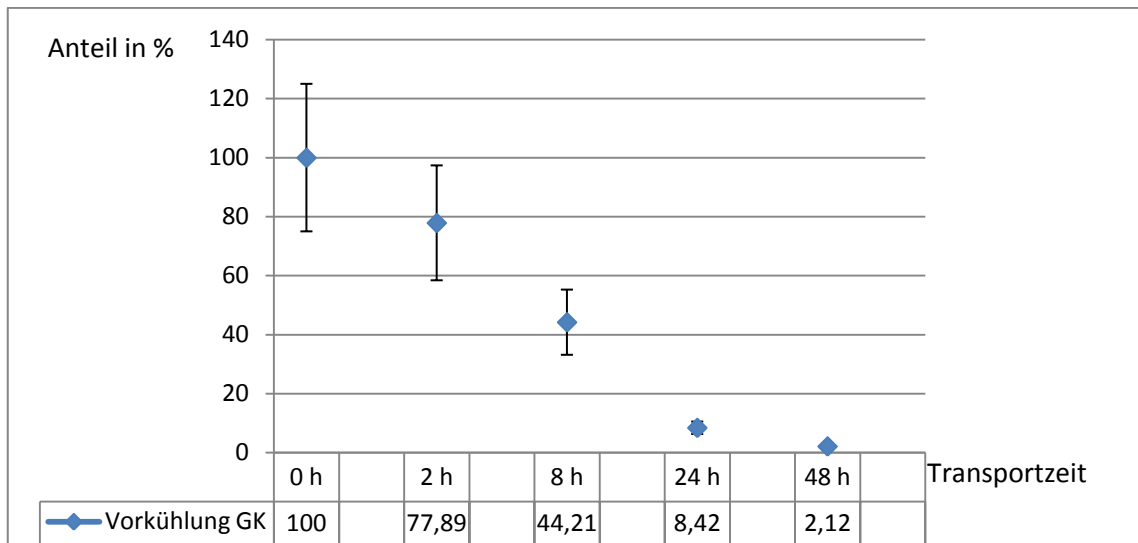


Abbildung 48: AP 10 GK

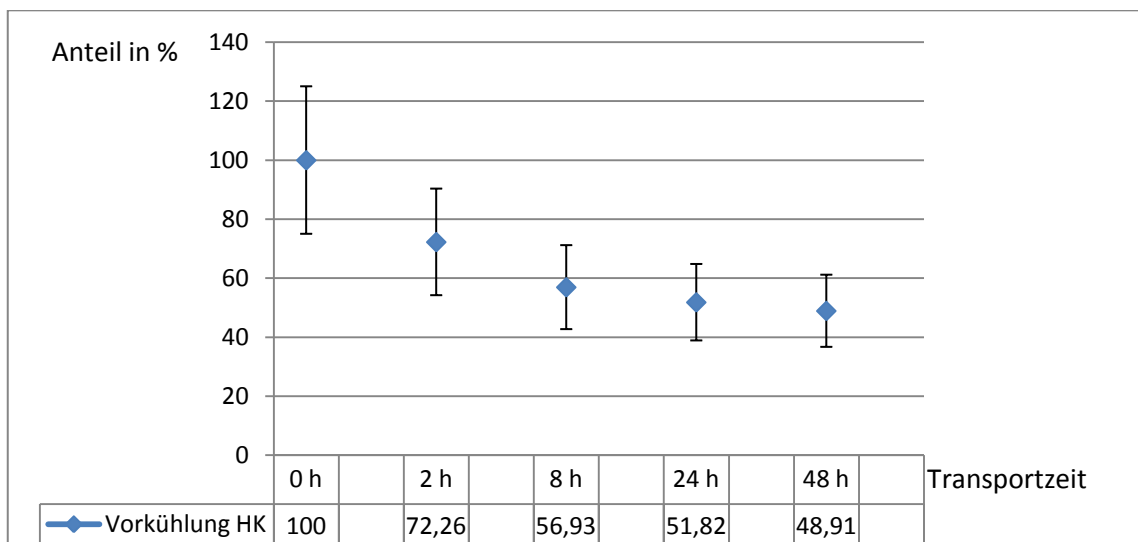


Abbildung 49: AP 10 HK

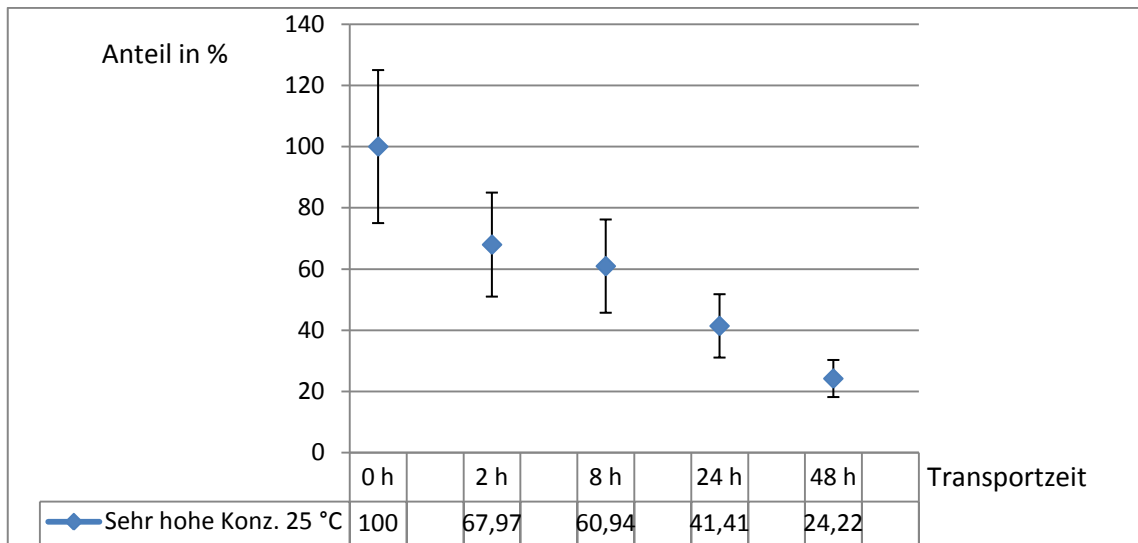


Abbildung 50: AP 14 25 °C

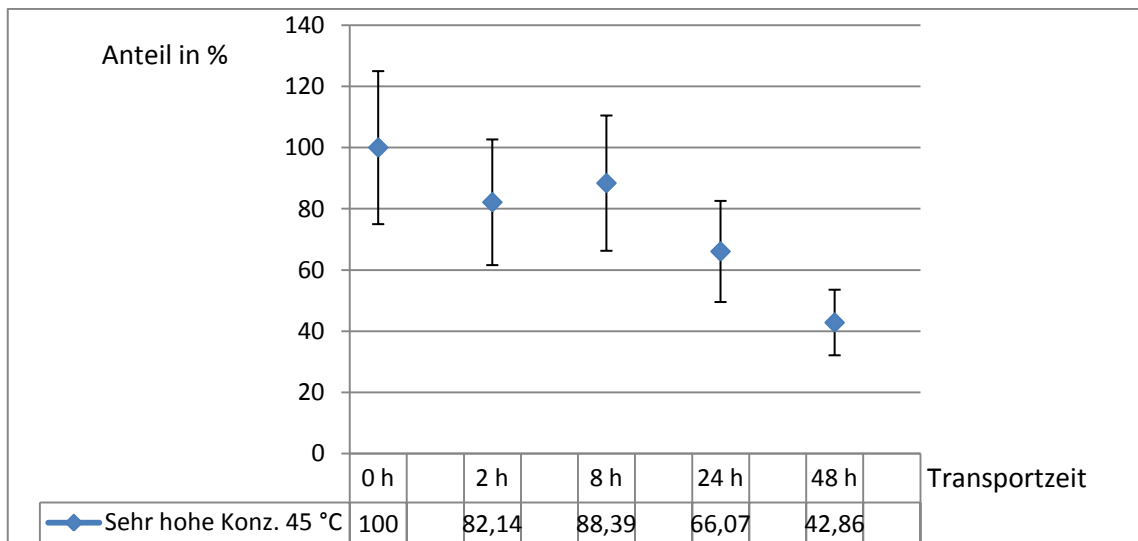


Abbildung 51: AP 14 45 °C

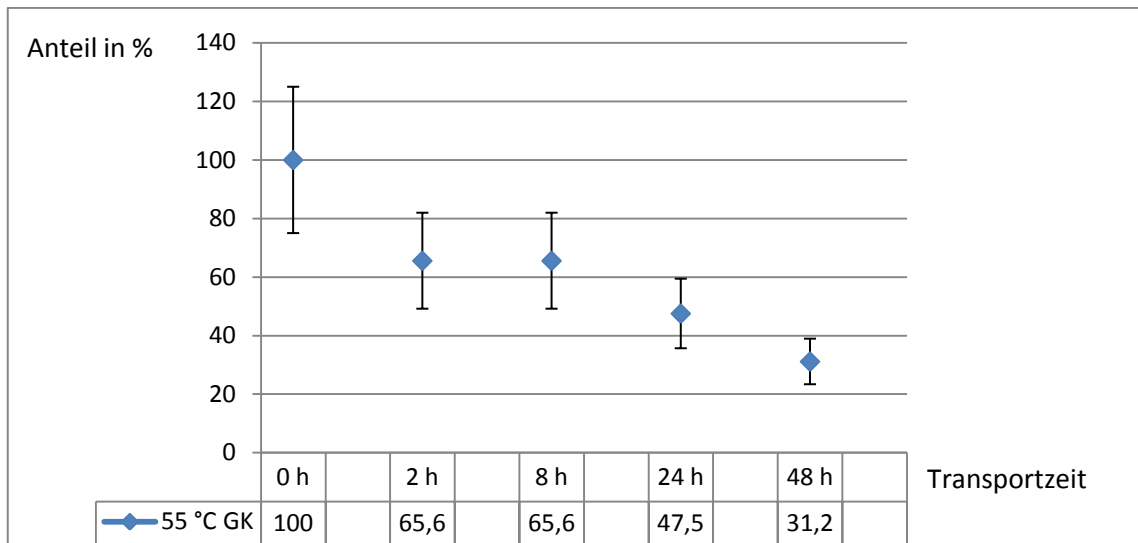


Abbildung 52: AP 15 GK

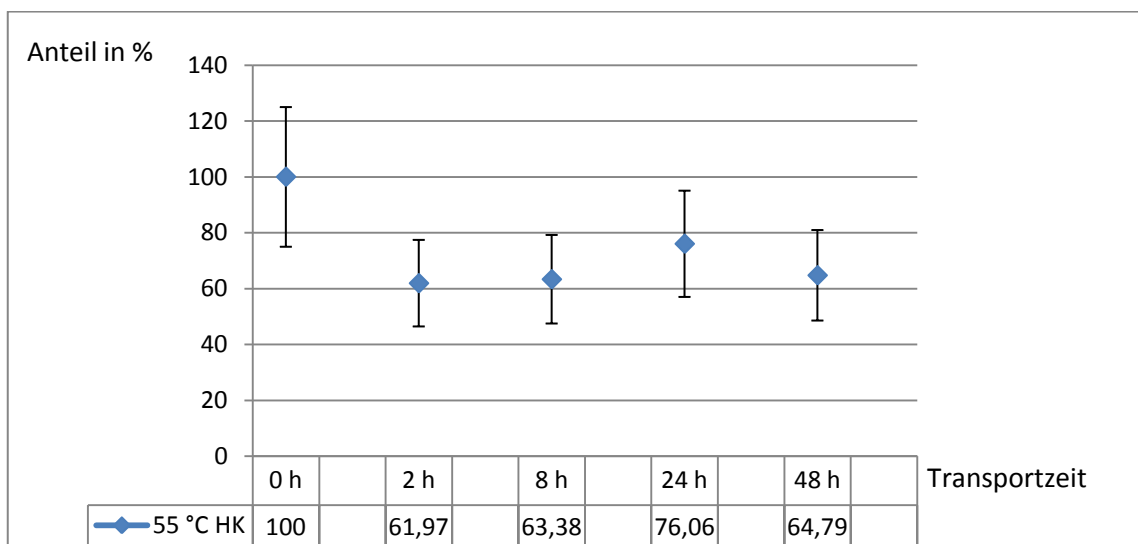


Abbildung 53: AP 15 HK

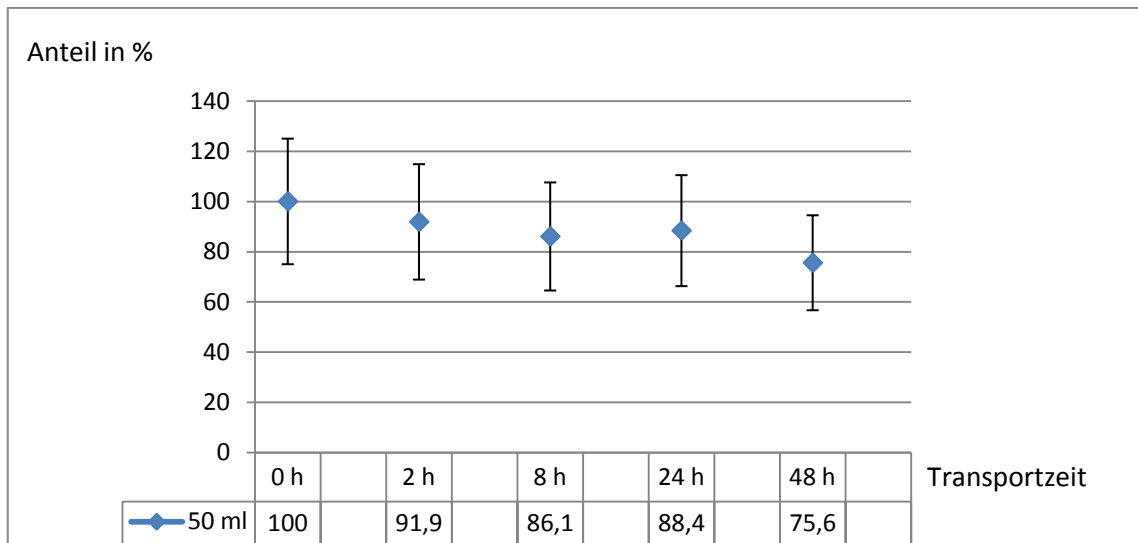


Abbildung 54: AP 23 50 ml

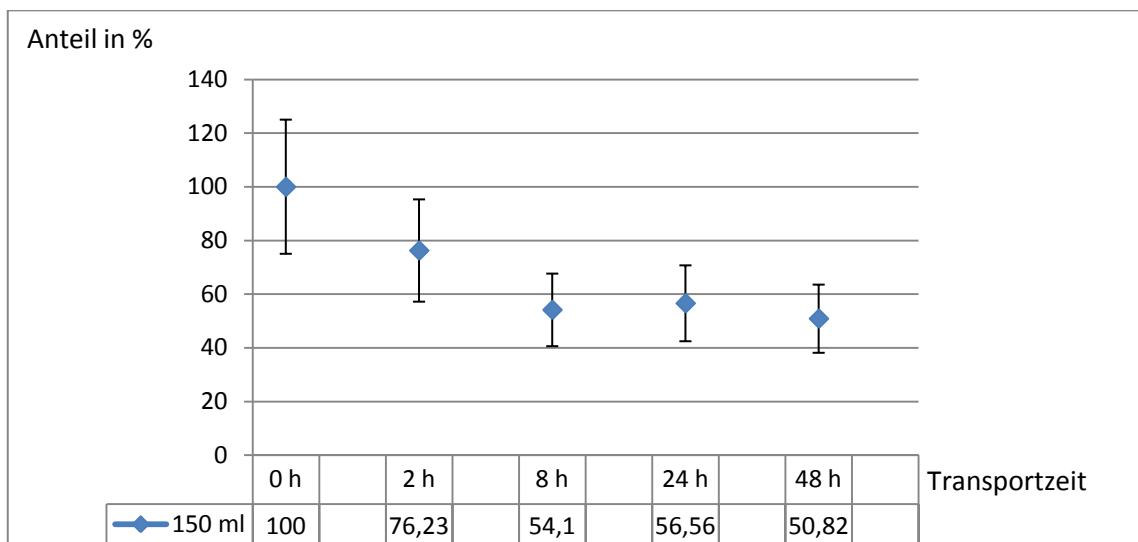


Abbildung 55: AP 23 150 ml

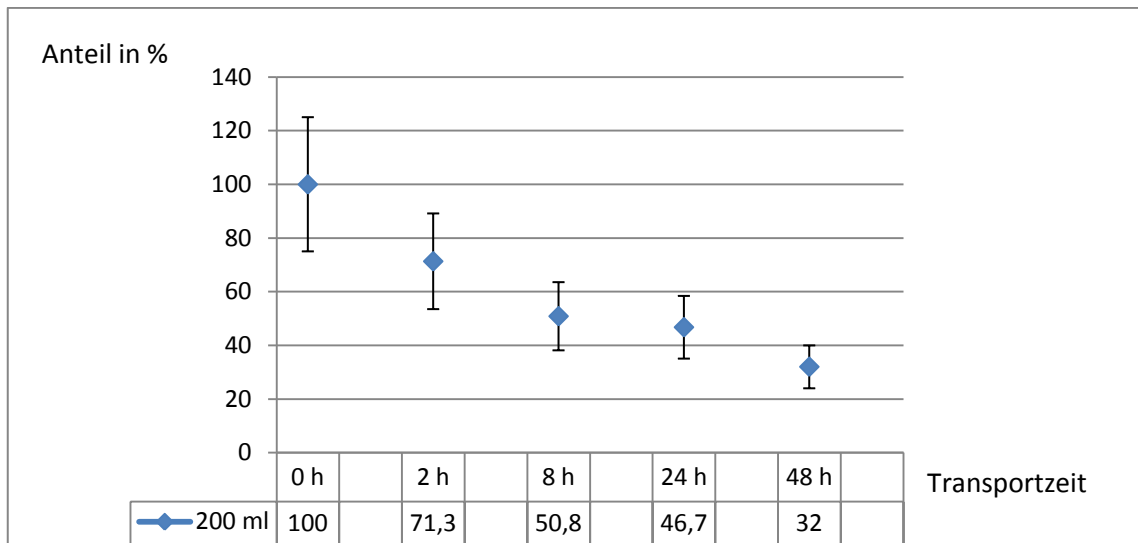


Abbildung 56: AP 23 200 ml

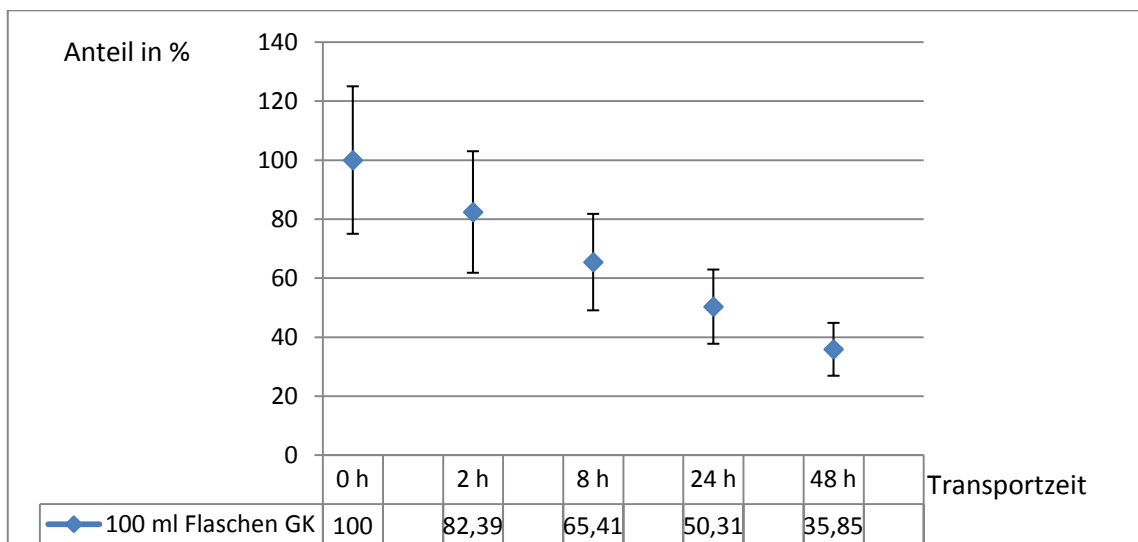


Abbildung 57: AP 24 GK

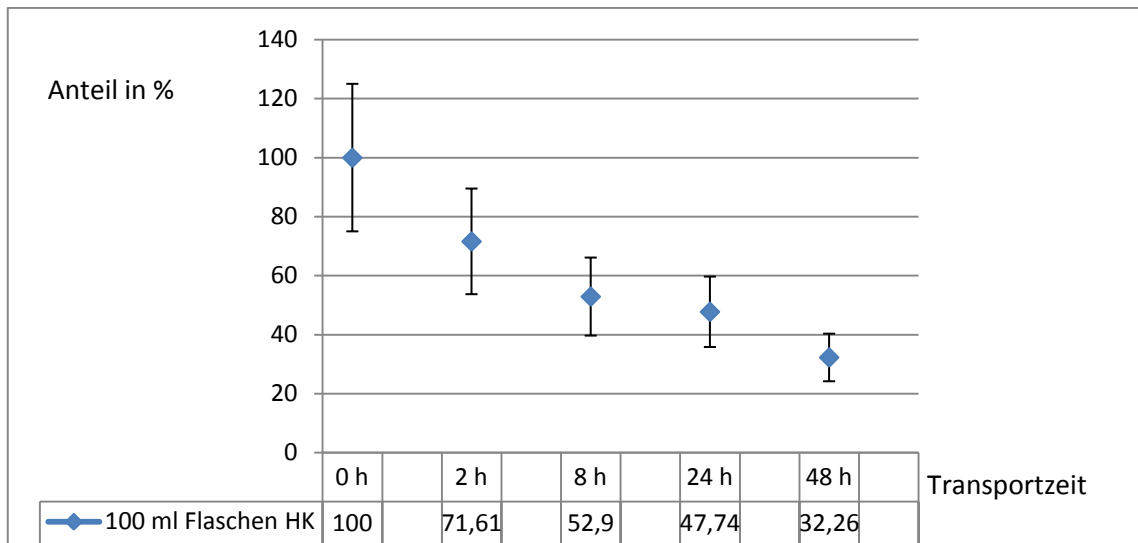


Abbildung 58: AP 24 HK

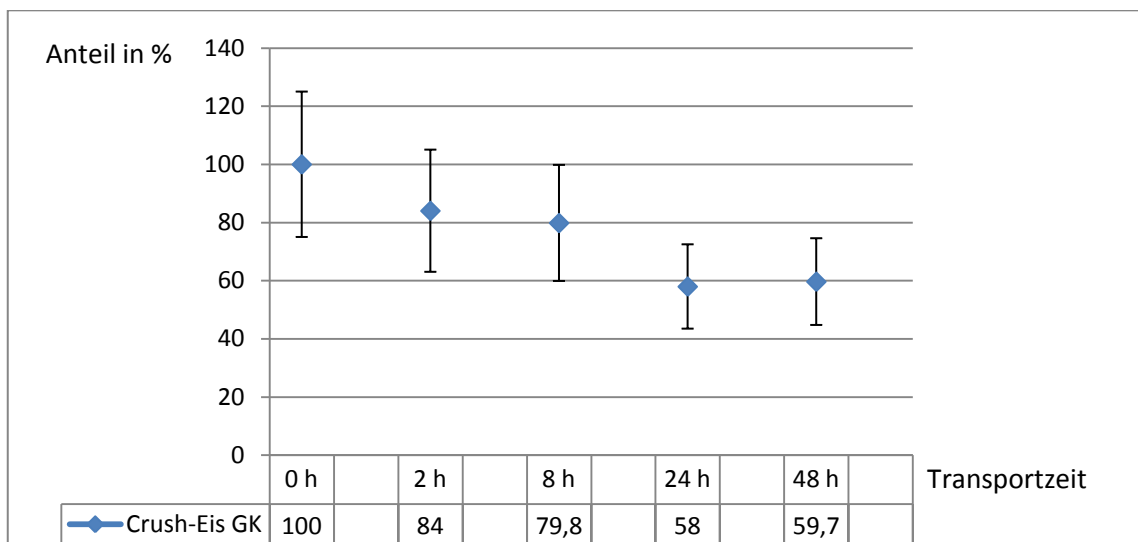


Abbildung 59: AP 25 GK

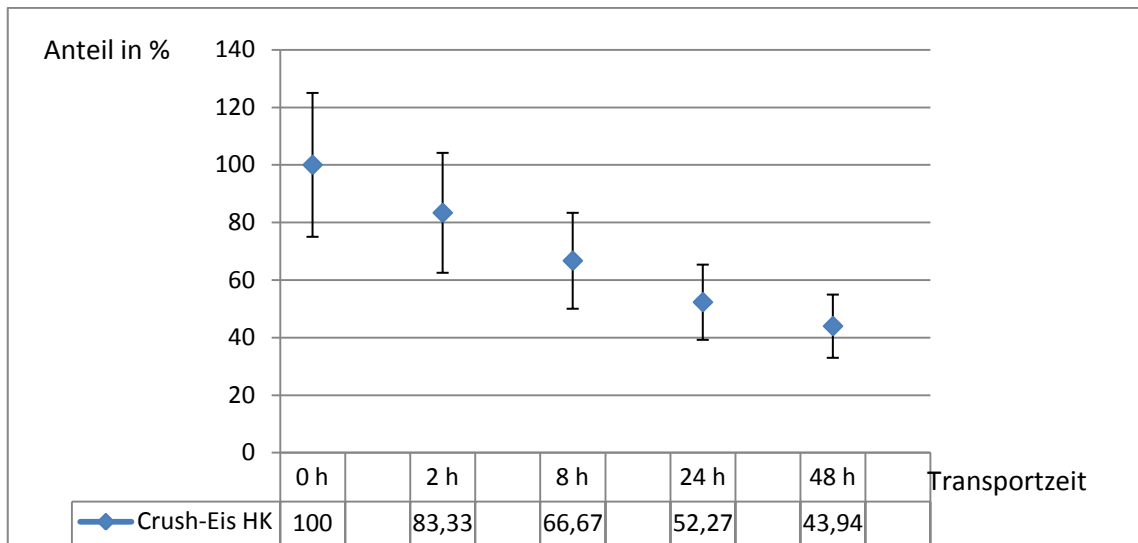


Abbildung 60: AP 25 HK

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 22.08.2013

Philipp Dörschmann